

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein -

Genomische Organisation und Mutationsanalyse
von drei Kandidatengenegen für die
Hereditäre Neuralgische Amyotrophie (HNA)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:
Gert Hünermund
aus Nairobi
2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein -

Genomische Organisation und Mutationsanalyse
von drei Kandidatengenen für die
Hereditäre Neuralgische Amyotrophie (HNA)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:
Gert Hünermund
aus Nairobi
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät des
Universitätsklinikums Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: PD Dr. med. F. Stögbauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.G. Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein -
Referent: PD. Dr. med. F. Stögbauer
Koreferent: Prof. Dr. med. H.G. Koch

ZUSAMMENFASSUNG

Genomische Organisation und Mutationsanalyse von vier Kandidatengenen für
die Hereditäre Neuralgische Amyotrophie (HNA)

Gert Hünermund

Die Hereditäre Neuralgische Amyotrophie (HNA) ist eine seltene, autosomal dominant vererbte, rekurrende fokale Neuropathie. Sie betrifft typischerweise den Plexus brachialis. Die Episoden sind geprägt von Schmerzen und motorischen Paresen sowie Atrophien besonders der Schultermuskulatur.

Die Ätiologie der HNA ist ungeklärt, jedoch werden regelmäßige Triggerfaktoren wie Infekte, Impfungen und Geburt beobachtet. Eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese wird für sehr wahrscheinlich erachtet. In einigen HNA-Familien findet sich weiterhin eine Assoziation mit dysmorphen Zeichen wie Hypotelorismus oder Epikanthus.

1996 wurde der Locus der prävalenten HNA-Form auf Chromosom 17q25 kartiert und seither mehrfach eingegrenzt. Aktuell beträgt seine Größe 3,5-cM.

In der vorliegenden Arbeit wird über die genomische Struktur sowie die Mutationsanalyse dreier Kandidatengene berichtet: Dies sind *Sphingosine Kinase-1 (SPHK-1)*, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP2)* und *LAK-4P*. Die Mutationsanalyse wurde auf der gesamten bekannten kodierenden Region durch direkte Sequenzierung durchgeführt.

Es konnten hierbei keine HNA-verursachenden Mutationen detektiert werden, so dass die genannten Gene mit höchster Wahrscheinlichkeit für die Pathogenese der HNA ausgeschlossen werden können. Nichtsdestotrotz konnten sechs neue Single-Nucleotide-Polymorphismen (SNPs) innerhalb dieser Gene identifiziert und charakterisiert werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2004.

Widmung

Meinen geliebten Eltern, die mir mit viel Liebe den Start ins Leben ermöglichten.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | V |
| | |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Hereditäre Neuralgische Amyotrophie (HNA) | 1 |
| 1.1.1 Definition der HNA | 1 |
| 1.1.2 Geschichte der HNA | 1 |
| 1.1.3 Klinik der HNA | 3 |
| 1.1.4 Verlauf der HNA | 4 |
| 1.1.5 Epidemiologie der HNA | 6 |
| 1.1.7 Ätiologie der HNA | 10 |
| 1.1.7.1 Allgemeines | 10 |
| 1.1.7.2 Triggerfaktoren der HNA | 10 |
| 1.1.7.3 Histopathologische Befunde der HNA | 11 |
| 1.1.8 Diagnostik der HNA | 13 |
| 1.1.8.1 Klinische Diagnostik der HNA | 13 |
| 1.1.8.2 "Anamnestische" Diagnostik der HNA | 14 |
| 1.1.8.3 Elektrophysiologische Diagnostik der HNA | 14 |
| 1.1.9 Differentialdiagnosen der HNA | 15 |
| 1.1.10 Therapie der HNA | 16 |
| 1.1.11 Genetik der HNA | 17 |
| 1.1.11.1 Kopplung von HNA und Hypotelorismus | 17 |
| 1.1.11.2 Kopplung auf Chromosom 17q25 | 17 |
| 1.1.11.3 Non-Linkage auf Chromosom 17q25 | 19 |
| 1.2 Kandidatengene | 20 |
| 1.2.1 Bisherige Kandidatengene | 20 |
| 1.2.2 Aktuelle Kandidatengene | 21 |
| 1.2.2.1 Homo Sapiens Sphingosinkinase-1 (SPHK-1)-Gen | 22 |
| 1.2.2.1.1 Lokalisation des SPHK-1-Gens | 22 |
| 1.2.2.2 Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)-Gen | 24 |
| 1.2.2.2.1 Lokalisation des TIMP2-Gens | 24 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 1.2.2.3 | Lymphocyte activated killer cells (LAK)-4P-Gen | 25 |
| 1.2.2.3.1 | Lokalisation des LAK-4P-Gens | 25 |
| 1.2.2.3.2 | Sequenzierung und Expression von <i>LAK-4P</i> | 25 |
| 1.3 | Fragestellung | 26 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 2.1 | Material | 27 |
| 2.1.1 | Patientenfamilien | 27 |
| 2.1.1.1 | Familie HNA-2 | 27 |
| 2.1.1.2 | Familie HNA-8 | 28 |
| 2.1.1.3 | Familie K4003 | 29 |
| 2.1.1.4 | Familie K4004 | 29 |
| 2.1.2 | Kontrollpersonen | 32 |
| 2.2 | Methoden | 33 |
| 2.2.1 | DNA-Präparation | 33 |
| 2.2.2 | Genomische Charakterisierung | 33 |
| 2.2.3 | Mutationsanalyse | 34 |
| 2.2.3.1 | Primer-Konstruktion | 34 |
| 2.2.3.2 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 35 |
| 2.2.3.3 | Agarosegelelektrophorese | 36 |
| 2.2.3.4 | Einzelstrang-Konformationsanalyse (single stranded conformational analysis, SSCA)..... | 37 |
| 2.2.3.5 | Silberfärbung | 38 |
| 2.2.3.6 | Sequenzierung | 38 |
| 2.2.3.6.1 | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 39 |
| 2.2.3.6.2 | Aufreinigung des PCR-Produktes | 39 |
| 2.2.3.6.3 | Sequenzierreaktion | 39 |
| 2.2.3.6.4 | Aufreinigung des Sequenzierreaktions-Produktes | 40 |
| 2.2.3.6.5 | Sequenzanalyse | 40 |
| 2.3 | Lösungen und Puffer | 41 |
| 2.4 | Geräte und Materialien | 42 |
| 3. | ERGEBNISSE | 44 |
| 3.1 | Ergebnisse zu <i>SPHK-1</i> | 45 |
| 3.1.1 | Genomische Organisation von <i>SPHK-1</i> | 45 |
| 3.1.2 | Primerdesign zu <i>SPHK-1</i> | 47 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.1.3 | Mutationsanalyse von <i>SPHK-1</i> | 48 |
| 3.1.3.1 | Detektierte Sequenzierfehler in AF266756 | 48 |
| 3.1.3.2 | Mutationsanalyse und Kontrollen | 50 |
| 3.1.4 | Kontrolle der Ergebnisse von <i>SPHK-1</i> mittels UniGene | 53 |
| 3.2 | Ergebnisse zu <i>TIMP2</i> | 54 |
| 3.2.1 | Genomische Organisation von <i>TIMP2</i> | 54 |
| 3.2.2 | Primerdesign zu <i>TIMP2</i> | 56 |
| 3.2.3 | Mutationsanalyse und Kontrollen von <i>TIMP2</i> | 57 |
| 3.3 | Ergebnisse zu <i>LAK-4P</i> | 59 |
| 3.3.1 | Genomische Organisation von <i>LAK-4P</i> | 59 |
| 3.3.2 | Primerdesign zu <i>LAK-4P</i> | 56 |
| 3.3.3 | Mutationsanalyse und Kontrollen von <i>LAK-4P</i> | 63 |
| 3.3.4 | Kontrolle der Ergebnisse von <i>LAK-4P</i> mittels UniGene | 71 |
| 3.3.5 | Ergebnisse der SSCP-Analyse zur Basenveränderung c.505-4G>A | 72 |
| 3.3.6 | Assoziation der c.505-4G>A-Transition mit HNA und dysomorphen Zeichen in der HNA-8-Familie | 73 |
| 4. | DISKUSSION | 74 |
| 4.1 | Allgemeines | 74 |
| 4.1.1 | Bedeutung der HNA | 74 |
| 4.1.2 | Kandidatengene | 74 |
| 4.1.2.1 | Prinzipielle Strategien zur Identifizierung von Krankheitsgenen | 74 |
| 4.1.2.2 | Vorgehen zur Identifizierung von Kandidatengenen der HNA | 75 |
| 4.1.2.3 | Probleme bei der Identifizierung von Kandidatengenen der HNA | 75 |
| 4.1.3 | Prinzipielle Betrachtung möglicher pathogener Mutationen | 77 |
| 4.1.4 | Fehlerquellen beim Mutationsnachweis | 79 |
| 4.2 | <i>Sphingosinkinase-1 (SPHK-1)</i> | 79 |
| 4.2.1 | Genomische Organisation von <i>SPHK-1</i> | 79 |
| 4.2.2 | Funktionelle Bedeutung von <i>SPHK-1</i> für die HNA | 80 |
| 4.2.2.1 | Potentielle Rolle von <i>SPHK-1</i> für die HNA | 80 |
| 4.2.3 | Mutationsanalyse von <i>SPHK-1</i> | 81 |
| 4.3 | <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)</i> | 82 |
| 4.3.1 | Genomische Organisation von <i>TIMP2</i> | 82 |
| 4.3.2 | Funktionelle Bedeutung von <i>TIMP2</i> | 83 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4.3.2.1 | Allgemeine funktionelle Bedeutung von <i>TIMP2</i> | 83 |
| 4.3.2.2 | MMPs und periphere Neuropathien | 84 |
| 4.3.2.2.1 | In-vitro-Beobachtungen | 85 |
| 4.3.2.2.2 | Beobachtung an Tiermodellen | 85 |
| 4.3.2.2.3 | MMPs bei inflammatorischen peripheren Neuropathien | 86 |
| 4.3.2.3 | Potentielle Rolle von <i>TIMP2</i> für die HNA | 86 |
| 4.3.3 | Mutationsanalyse von <i>TIMP2</i> | 87 |
| 4.4 | <i>Lymphocyte activated killer cells (LAK)-4P</i> | 88 |
| 4.4.1 | Genomische Organisation von <i>LAK-4P</i> | 88 |
| 4.4.2 | Funktionelle Bedeutung von <i>LAK-4P</i> | 88 |
| 4.4.2.3 | Potentielle Rolle von <i>LAK-4P</i> für die HNA | 88 |
| 4.4.3 | Mutationsanalyse von <i>LAK-4P</i> | 88 |
| 4.5 | Mögliche Fehlerquellen und Probleme | 93 |
| 4.6 | Zusammenfassung und Ausblick | 94 |
| 4.6.1 | Zusammenfassung | 94 |
| 4.6.2 | Ausblick | 95 |
| 5. | LITERATURVERZEICHNIS | 97 |
| | DANKSAGUNG | 110 |
| | LEBENS LAUF | 111 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| Abkürzung | Bedeutung |
|-----------|--|
| AS | Aminosäure |
| b | Basen |
| BAC | Bacterial artificial chromosome |
| bp | Basenpaare |
| c | cDNA |
| dNTP | Nukleotid-Mix |
| EAN | Experimentelle autoimmune Neuritis |
| EDG | Endothelial differentiation gene |
| EST | Expressed sequence tag |
| GBS | Guillain-Barré-Syndrom |
| GPCR | G-protein-coupled-receptor, G-Protein-gekoppelter Zelloberflächenrezeptor |
| HNA | Hereditäre Neuralgische Amyotrophie |
| HNPP | Hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckläsionen |
| htgs | High throughput genomic sequence |
| I | Interner Primer |
| KS | Kodierende Sequenz |
| LAK-4P | Lymphocyte activated killer cells |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| NB | Nicht bestimmbar |
| nr | Non-redundant |
| NSAP | Nichtsteroidale Antiphlogistika |
| ORF | Open reading frame |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PMP22 | Peripheral myelin protein 22 |
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| SPHK-1 | Sphingosinkinase-1 |
| SPP | Sphingosin-1-phosphat |
| SSCA | Einzelstrang-Konformations-Analyse; Single stranded conformational analysis |

| | |
|----------------|---------------------------------------|
| SThM | Sialyltransferase |
| STR | Short-tandem-repeat |
| TIMP | Tissue inhibitor of metalloproteinase |
| T _m | Schmelztemperatur |
| UTR | Untranslatierte Region |

1 EINLEITUNG

1.1 Hereditäre Neuralgische Amyotrophie (HNA)

1.1.1 Definition der HNA

Die Hereditäre Neuralgische Amyotrophie (HNA; MIM-Nr: 162100) ist eine seltene, autosomal dominant vererbte Erkrankung, die zu wiederkehrenden Episoden mit initial schweren Schmerzen gefolgt von Paresen und Atrophien des Schultergürtels und der oberen Extremitäten führt (117). Sie wird auch als Plexus-brachialis-Neuropathie, Hereditäre Amyotrophie oder Hereditäre Neuralgie mit Prädilektion des Plexus brachialis bezeichnet.

1.1.2 Geschichte der HNA

Bereits 1886 schilderte Dreschfeld in England in einem Bericht über seltene Formen von Muskelatrophien eine Fallgeschichte familiärer Neuropathie des Plexus brachialis (21): Er beschrieb ein Schwesternpaar, das wiederholte Attacken mit Schmerzen, Paresen und Atrophien der proximalen und distalen Armmuskeln erlitt. Obwohl er diese Erkrankung als „rheumatic peripheral neuritis“ bezeichnete, wird sie heute als erste Fallschilderung der HNA betrachtet.

1933 beschrieb Ungley eine Mutter und ihre zwei Töchter, die eine im wesentlichen gleichartige Symptomatik erlitten hatten (107). Er betonte erstmals die Assoziation von Schwangerschaft oder Geburt mit dem Auftreten der Symptome.

Auch Taylor betonte 1960 gesondert die Assoziation der Attacken mit Schwangerschaft (104). Er beschrieb detailliert eine 119-köpfige Familie über fünf Generationen, aus der 24 Angehörige an einer oder mehreren Attacken akuter Neuritis des Plexus brachialis litten. Diese waren charakterisiert durch quälende Schmerzen, starke Paresen, Atrophie und Gefühlsstörungen. Er

schilderte weiter den typischerweise gutartigen Verlauf mit kompletter oder fast kompletter Erholung und die fast identische Geschlechterverteilung. Nichtsdestotrotz beschrieb er auch schwere residuale Defizite und die Beteiligung von Hirnnerven. Aus der Studie des Stammbaumes folgte er einen autosomal dominanten Vererbungsmodus mit einem hohen, aber unvollständigen Maß an Penetranz. Weiter vermutete er aufgrund der beobachteten Ähnlichkeit zum Bild der sogenannten „serum neuritis“ eine genetisch vermittelte Empfindlichkeit für hypererge Reaktionen, womit er als erster den kausativen Effekt in den Bereich des Immunsystems verwies.

1961 verfasste Jacob einen Übersichtsartikel über die drei zuvor geschilderten Berichte und fügte die Darstellung von sieben Patienten aus zwei nichtverwandten Familien mit ähnlichen Episoden und ähnlichem Verlauf hinzu (38). Auch er berichtete über die Beteiligung (unterer) Hirnnerven sowie auch des Plexus lumbalis und des autonomen Nervensystems. Darüberhinaus betonte er, die „Tendenz zur Neuritis“ scheine in einer Familie „genetisch gekoppelt an Kleinwuchs und eine eigentümliche Physiognomie“. Auch in der zweiten Familie beschrieb er dysmorphe Zeichen, namentlich engstehende Augen (Hypotelorismus) und Gesichtasymmetrie.

In der Folge häuften sich die Fallberichte: Gardner beschrieb 1968 die Verknüpfung hereditärer brachialer und kranialer Neuritis mit Hypotelorismus und Syndaktylie (28). Im gleichen Jahr präsentierte Poffenbarger eine Familie über drei Generationen, aus der sieben Angehörige mehrfache HNA-Attacken mit besonders häufiger Einbeziehung des N. laryngeus recurrens erlitten. Auch er erwähnte als Triggerfaktoren Schwangerschaft, Geburt und Infektionskrankheiten und beschrieb die Assoziation mit Hypotelorismus (82).

Weitere Darstellungen von verwandten Personen und Familien mit HNA folgten und wiederholt fanden sich Schilderungen typischer Triggerfaktoren und dysmorpher Zeichen (3, 6, 7, 22, 26, 29, 33, 59, 72, 80, 88, 97, 105, 111, 114, 122).

Bemerkenswert erscheint, dass die Namensgebung der HNA im Verlauf der geschilderten Darstellungen mehrfach wechselte: Nach der initialen Bezeichnung als „rheumatic peripheral neuritis“ durch Dreschfeld 1886 wurde

sehr schnell der Begriff der „heredofamilial neuritis with brachial predilection“ geprägt. Dieser wurde ab ca. 1973 wieder fallengelassen und durch den Begriff der „hereditary recurrent brachial neuropathy“ bzw. der „hereditary recurrent brachial neuritis“ ersetzt. Hierzu wiederum bemerkte Geiger (29) 1974, dass ihm dieser Begriff nicht akkurat erscheine, da die Erkrankung sowohl den Plexus lumbalis als auch Hirnnerven betreffen könne und verwendete daher erstmalig den Begriff der „familial neuralgic amyotrophy“. Dunn (22) und Arts (6) benutzten zur Beschreibung des familiären Charakters später das Wort „hereditary“ und beide Begriffe, „hereditary neuralgic amyotrophy“ und „familial neuralgic amyotrophy“, wurden in der Folge parallel verwendet und eventuell durch die Beschreibung der brachialen Prädilektion - „with brachial predilection“ - ergänzt. Ab den 90er Jahren setzte sich schließlich die Bezeichnung der „Hereditären Neuralgischen Amyotrophie“ zunehmend durch.

1.1.3 Klinik der HNA

Die Symptome einer akuten HNA-Episode sind in ihrer Abfolge sehr charakteristisch: Sie beginnt mit starken, stechenden Schmerzen der betroffenen Extremität, die durch Bewegung, Kälteexposition, physikalischen oder emotionalen Streß verstärkt werden können und durchschnittlich 8 von 10 Punkte auf einer Visuellen Analogskala erreichen (150, 108). Die Schmerzen können zwischen 4 Tagen und 3 Wochen andauern.

In der Folge kommt es zur raschen Entwicklung vorwiegend motorischer Defizite mit Paresen und Atrophien. Diese betreffen typischerweise die Muskulatur der Arme und des Schultergürtels. Van Alfen beschrieb 2000 eine Einbeziehung des Plexus brachialis in 75-82% der untersuchten 24 sowie der revidierten 197 Literatur-Patienten. 56% der akuten Neuropathien des Plexus brachialis manifestierten sich dabei rechtsseitig, 24% linksseitig und 20% beidseitig (108). Das Überwiegen der rechten Seite repräsentiert hierbei wahrscheinlich das Überwiegen der Rechtshändigkeit in der Bevölkerung, da starke Belastung des betroffenen Armes als ein möglicher Auslösefaktor gilt (zu weiteren Triggerfaktoren siehe 1.1.7).

Nur bei wenigen Patienten finden sich akut auch sensible Defizite. Allerdings ergaben Verlaufsuntersuchungen Hypästhesien verschiedener Hautareale bei 58%, gnostische Hypästhesien bei 33%, Dysästhesien bei 29% und Parästhesien bei 42% der Patienten (108).

Nur in ca. 12% der Fälle findet sich eine Manifestation am Plexus lumbosacralis. Hier verteilen sich die motorischen Defizite zu je 33% auf die rechte, linke sowie beide Seiten (108). Dies untermauert die Auffassung, dass die ungleichmäßige Verteilung der motorischen Defizite an den Armen durch die ungleiche Verteilung der Händigkeit entsteht. Denn natürlicherweise ist die Belastung an den Beinen gleich verteilt.

Selten sind auch Hirnnerven (N. facialis, N. vestibulocochlearis, N. hypoglossus) betroffen (3, 104, 117). Besonders Aphonien durch Paresen des N. laryngeus recurrens wurden mehrfach beschrieben (3, 29, 38, 82, 104).

Nur sehr selten kommt es zu autonomen Störungen mit Horner-Syndrom, (29, 108, 104), veränderter Schweißsekretion (38, 108), oder vasomotorischen Veränderungen (108).

Ebenfalls sehr selten wurden alleinige Schmerzen ohne folgende weitere neurologische Defizite beschrieben, (29, 82), Stögbauer et al (unveröffentlicht).

HNA-Episoden können wiederholt auftreten und sich dann ipsi-, kontra- oder bilateral manifestieren. Die Zahl der Episoden variiert zwischen 1-20 und liegt bei der meisten Patienten zwischen 1-5. Auch die Dauer der Intervalle zwischen den Episoden variiert sehr.

1.1.4 Verlauf der HNA

Generell gilt der Verlauf der HNA als sehr gutartig. In der Regel findet sich eine vollständige oder fast vollständige Rückbildung der Symptome ohne bleibende Behinderung des Patienten. Nur selten, zumeist bei Patienten mit mehreren Episoden, verbleiben schwere Defizite. Die Lebenserwartung der HNA-Patienten ist normal.

1983 unternahmen Arts et al. erstmals eine Unterteilung der HNA-Attacken in zwei Typen. Sie unterschieden: 1) Einen „klassischen“ Attackentyp mit einmal auftretenden Schmerzen und Paresen, die über Wochen bis Monate anhalten. 2) Einen Attackentyp mit rekurrenden Schmerzen und Paresen, die ein paar Tage andauern, aber über mehrere Monate ca. einmal pro Woche wiederkehren (6). Im Jahr 2000 beschrieben van Alfen et al. eine Analyse des Krankheitsverlaufes von 24 Patienten aus 9 Familien (108): Sie fanden zwei verschiedene Verlaufstypen, die sie als „klassisch“ und „chronisch“ bezeichneten. Der „klassische“ Typ (Abb.1) repräsentiert dabei den, in vielen Publikationen beschriebenen, sogenannten „relapsing-remitting“-Verlauf. Hier setzt nach Wochen bis hin zu Monaten und sogar Jahren eine langsame komplette oder fast komplette Rückbildung der Symptome ein. Im Intervall, das durchschnittlich 8 Jahre beträgt, sind die Patienten immer schmerzfrei und meist symptomfrei.

Der „chronische“ Verlaufstyp (Abb.1) nach van Alfen et al. hingegen ist undulierend. Vor Auftreten der ersten Attacke findet sich über einen Zeitraum von 6 Wochen bis 2 Jahren ein schleichendes Einsetzen der Symptomatik. Während der Attacke herrschen auch hier Schmerzen sowie motorische Defizite vor. Im weiteren Verlauf allerdings kommt es nur zur teilweisen Rückbildung der Schmerzsymptomatik, während vorhandene Paresen sich nicht mehr wesentlich bessern. Auf diese anhaltende klinische „Grundlinie“ lagern sich weitere Attacken undulierend auf, wodurch es zur Summation motorischer Defizite kommt.

Beide Verlaufstypen verteilten sich zu je 50% auf die untersuchten 24 Patienten. Pro Familie fand sich lediglich ein Verlaufstyp.

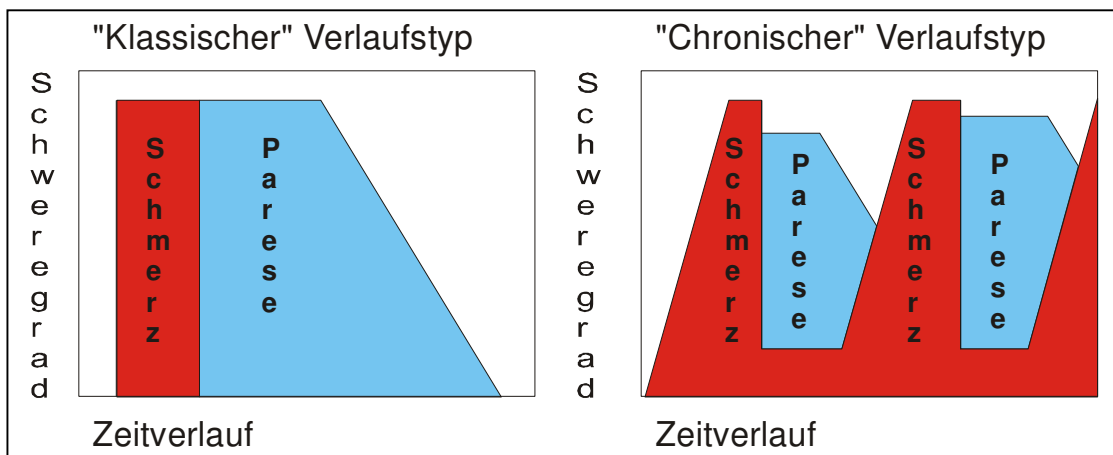


Abb.1: Verlaufstypen der HNA nach van Alfen et. al, Brain, 2000

1.1.5 Epidemiologie der HNA

Die Inzidenz der HNA wird üblicherweise als $<1:10.000$ angenommen.

Der durchschnittliche Alter des Erstmanifestation der HNA beträgt 24 Jahre in der von van Alfen et al. untersuchten Gruppe und 34 Jahre in der von ihnen revidierten Literatur (108). Üblicherweise werden die zweite und dritte Lebensdekade als Altersgipfel für die Erstmanifestation angesehen (103). Nichtsdestotrotz wurden auch Erstmanifestationen vom ersten Lebensjahr bis ins hohe Alter beobachtet (Stögbauer et al, unveröffentlichte Beobachtung).

Hinsichtlich der Verteilung der bekannten Familien existiert keine erkennbare geographische Häufung, allerdings stammen alle bisher beschriebenen Familien aus Europa oder den USA und sind weißer Hautfarbe.

1.1.6 Weitere Charakteristika der HNA

Sehr häufig, aber nicht immer, ist die HNA assoziiert mit dysmorphen Zeichen: Bereits 1961 beschrieben Jacob et al., die „Tendenz zur Neuritis“ scheinbar „genetisch gekoppelt an Kleinwuchs und eine eigentümliche Physiognomie“ zu sein (38). Vielfache Publikationen bestätigten diese Beobachtung.

Folgende dysmorphe Zeichen wurden geschildert:

- Hypotelorismus (siehe Abb.1.1.7.1) (3, 6, 22, 29, 33, 38, 39, 72, 78, 82, 97, 104, 108, 122), Stögbauer et al. (unveröffentlichte Beobachtung)
- Faziale Dysmorphien allgemein (26, 80)
- Epikanthus (siehe Abb. 1.1.7.1) (78, 122), Stögbauer et al. (unveröffentlichte Beobachtung))
- Syndaktilie (28, 29)
- Palatoschisis (3, 26, 29, 39)
- Schmales Gesicht (72,122)
- Enge Fissurae palpebrales (3, 72)
- Brustkorbfehlformen: Trichterbrust (3), Hühnerbrust (72)
- Kleinwüchsigkeit (38, 113)
- Kleine Mundöffnung (3)
- Faziale Asymmetrie (38)
- Uvula bifida (29)
- Fusion von Ulna und Radius (29)
- Kurze, plumpe Finger (3)
- Langer Nasenrücken (78,104)
- Überschießende Hautfalten an den Unterarmen (78) sowie am Nacken, Kopf und den Extremitäten von Kindern (39)
- Bilateraler pes cavus (108)



Abb.2: Ausschnitt aus Amedeo Modigliani, Reclining Nude from the Back (Nu couche de dos), 1917, Barnes Foundation, Merion, PA, USA.

Der Ausschnitt illustriert Hypotelorismus, Epikanthus, langen Nasenrücken und kleine Mundöffnung.

Es bleibt jedoch zu betonen, dass nicht alle HNA-Familien dysmorphe Zeichen aufweisen und auch nicht innerhalb der selben Familie durchgängig vorhanden sein müssen. Es handelt sich also um eine Assoziation, aber keineswegs um eine Kosegregation. Dies veranschaulicht Abb.3: Innerhalb einer HNA-Familie zeigt ein Zweig eine Assoziation der HNA mit Hypotelorismus und Epikanthus, während ein anderer Zweig lediglich eine Assoziation der HNA mit Hypotelorismus ohne Epikanthus aufweist.

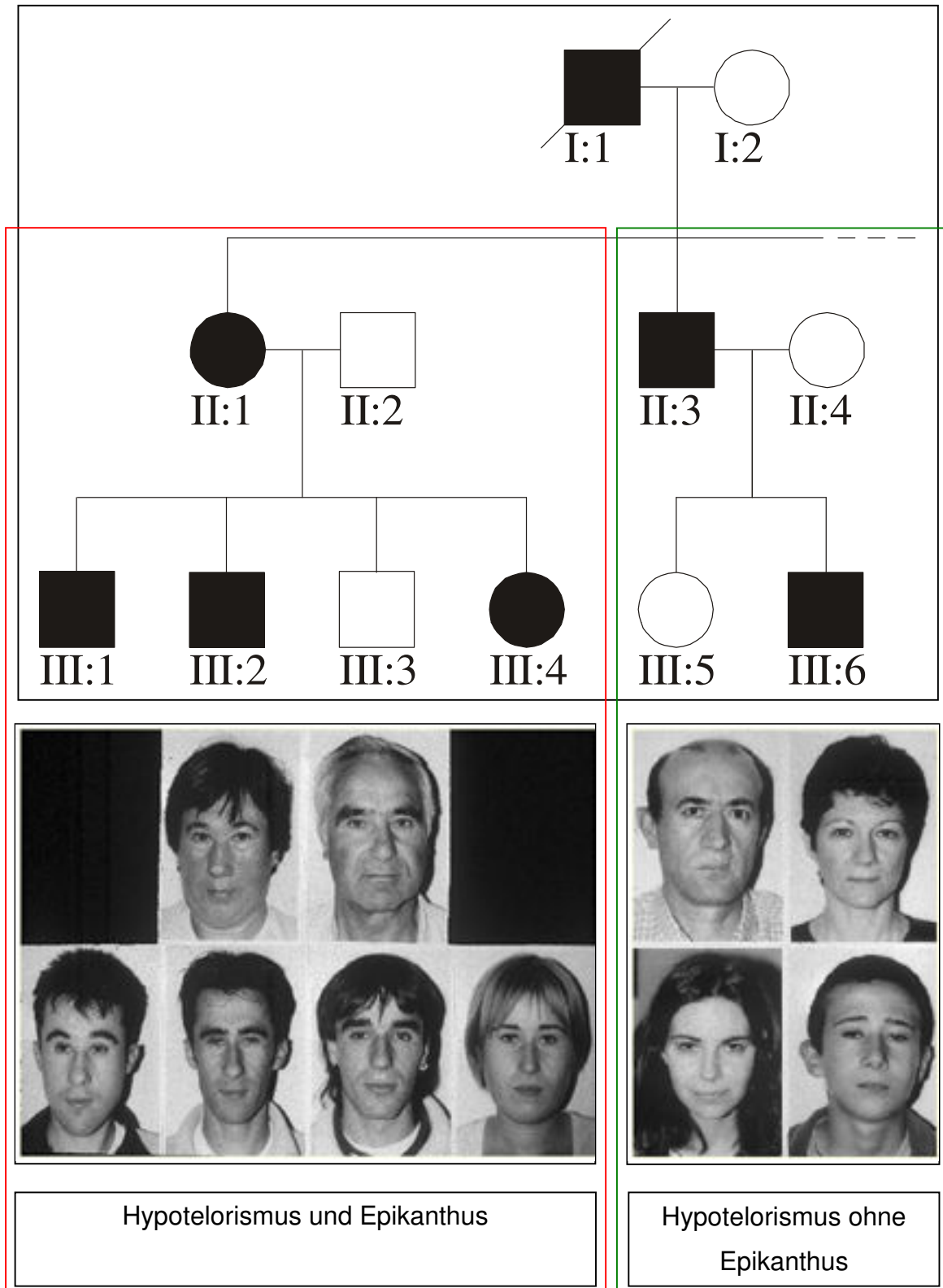


Abb.3: Intrafamiliäre Assoziation von HNA mit dysmorphen Zeichen: Im links dargestellten Arm ist die HNA mit Hypotelorismus und Epikanthus assoziiert, während sie im rechts dargestellten Arm lediglich mit Hypotelorismus assoziiert ist.

Jeannot et al. bemängeln in einer neueren Studie den unkritischen Gebrauch des Begriffes „Hypotelorismus“ sowie die Beschreibung von Eindrücken ohne durchgeführte Messungen. Sie vermaßen 27 Erkrankte aus sieben HNA-Familien und fanden eine signifikante Reduktion des interpupillären sowie interkanthalen Abstandes sowie Hypotelorismus bei 76% der Patienten. Bei keinem Patienten jedoch konnten sie eine gedrungene Statur feststellen (39).

1.1.7 Ätiologie der HNA

1.1.7.1 Allgemeines

Die Ätiologie der HNA ist ungeklärt. Sowohl die assoziierten dysmorphen Zeichen als auch zahlreiche beobachtete, häufig den HNA-Attacken vorausgehende, Triggerfaktoren führten jedoch zu zahlreichen Spekulationen über die Ätiologie bzw. den kausativen Defekt der HNA.

Vor der Schilderung möglicher kausativer Zusammenhänge sollen aber zunächst die erwähnten Triggerfaktoren sowie histopathologische Befunde dargestellt werden.

1.1.7.2 Triggerfaktoren der HNA

Bereits in den frühen Publikationen zur HNA wurden Faktoren beschrieben, die den HNA-Attacken häufig vorangingen. Die Art und Zahl dieser Triggerfaktoren wurde in der Folge vielfach bestätigt und erweitert.

Geschilderte Faktoren sind:

- Schwangerschaft (82, 104, 107, 112)
- Geburt (3, 33, 38, 62, 82, 105, 107, 112)
- Infektionskrankheiten allgemein (3, 82, 104) bzw. Infektionen des oberen Respirationstraktes (3, 29), grippale Infekte (3, 22, 29), Mononukleosis infektiosa (29), Masern, Pneumonie, Pharyngitis, Scharlach (22)
- Fieber (29)

- Appendizitis (29)
- Impfung (29, 106)
- Intramuskuläre Antibiotikuminjektion (29)
- Zugluft und Kälteexposition (3, 29, 46)
- Starke Beanspruchung der betroffenen Extremität (3, 72, 112)
- Gips an der betroffenen Extremität (46)
- Emotionaler Streß und Belastungen (8, 104, 112)

1.1.7.3 Histopathologische Befunde der HNA

Nur in zwei Studien konnten bisher histopathologische Befunde an HNA-Patienten erhoben werden:

Arts et al beschrieben 1983 die Ergebnisse sowohl einer Biopsie des N. suralis eines Indexpatienten als auch Autopsieergebnisse der ebenfalls erkrankten Mutter des Indexpatienten: Die Biopsie des N. suralis des 44-jährigen Indexpatienten fünf Monate nach der letzten Attacke zeigte einen Verlust myelinisierter Nervenfasern als Hinweis auf eine axonale Schädigung. Die Autopsie der 72-jährigen Mutter vier Stunden post mortem ergab keine wesentlichen Veränderungen des Rückenmarks, der Nervenwurzeln und beider Plexus. Die letzte Attacke hatte 30 Jahre zuvor stattgefunden, aber sie hatte Paresen und Atrophien der Arm- und Schultergürtelmuskulatur zurückbehalten (6).

Stögbauer et al. berichteten 2000 von den Biopsie-Ergebnissen eines betroffenen N. cutaneus antebrachii: Es fanden sich axonaler Untergang sowie sekundäre Demyelinisierung (101).

Klein et al. schilderten 2001 die Befunde von sensiblen N. radialis-Biopsien an zwei HNA-Patienten: Beide zeigten markante axonale Degeneration sowie epineurial perivaskulär lokalisierte Infiltrate inflammatorischer mononukleärer Zellen (42).

1.1.7.4 Zusammenfassung zur Ätiologie

Wie im Folgenden (1.1.11, Genetik der HNA) dargelegt wird, existiert eine klare Kopplung der HNA zu Chromosom 17q25, ohne dass der Gendefekt bisher bekannt ist. Da Betroffene jedoch nur unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel nach beschriebenen Triggerfaktoren, phänotypisch auffällig werden, muß es sich bei der Ätiologie der HNA um ein multifaktorielles Geschehen handeln.

Diesbezügliche Spekulationen beziehen sich auf mehrere bekannte Kriterien:

- Elektrophysiologische Befunde weisen auf einen axonalen Schädigungsmechanismus hin.

Weil Geburten, Überbelastung bzw. ein Gipsverband des betroffenen Armes als Auslösefaktoren beobachtet wurden, wurde schon früh eine mechanisch verursachte Irritation in Betracht gezogen. Hier ist Vorsicht gegenüber einer Verwechslung mit der Hereditären Neuropathie mit Neigung zu Druckläsionen (HNPP) geboten. Insgesamt scheint eine mechanische Irritation unwahrscheinlich, da die Mehrzahl der Triggerfaktoren nichtmechanischer Art ist. Auch der Versuch, Attacken infolge des Geburtsvorganges durch einen Kaiserschnitt zu verhindern, schlug fehl (42).

- Die häufig beschriebenen Triggerfaktoren Schwangerschaft und Geburt legen hormonelle Faktoren als Teil des kausativen Geschehens nahe. Bei männlichen Patienten wurde eine Parallele (z.B. Pubertät) jedoch nicht beobachtet. Auch die Geschlechterverteilung ist ungefähr gleich.
- Die oftmals mit der HNA assoziierten dysmorphen Zeichen lassen verschiedene Vermutungen zu: Hinsichtlich der Zahl der betroffenen Gene läßt sich prinzipiell festhalten, dass einerseits die Schädigung eines einzigen Genes gleichzeitig zur Ausprägung von HNA und Dysmorphien führen könnte. Dagegen spricht aber die lediglich lockere Assoziation ohne klare Kosegregation. Zum anderen jedoch könnte ein, die HNA verursachender Defekt, indirekt Auswirkungen auf die Expression weiterer Gene haben, die in der Folge zur Dysmorphogenese führen. Auch eine größere strukturelle Veränderung könnte gleichzeitig mehrere Gene schädigen. In beiden letzteren

Fällen ließe sich die fehlende Seggregation von HNA und dysmorphen Zeichen durch stattfindende Rekombinationen erklären. Bezüglich der Ätiologie könnten die dysmorphen Zeichen aber auch hinweisend auf eine fehlerhafte Genexpression im Bindegewebe sein, die zu Dysfunktionen sowohl der Ontogenese als auch des plexusnahen Bindegewebes führt, z.B. über eine Fehlregulierung plexusprotektiver Substanzen oder eine Veränderung der plexusnahen Vaskularisierung.

Insgesamt erinnern die charakteristischen Triggerfaktoren der HNA jedoch an Auslöser, die bei bekannten oder vermuteten Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, Guillain-Barré-Syndrom, Akuter Disseminierter Enzephalomyelitis oder Hypersensitivitätsvaskulitis beschrieben sind. In Kombination mit den beobachteten perivaskulären mononukleären Infiltraten legt dies die Vermutung nahe, dass es sich auch bei der HNA um eine Autoimmunerkrankung handelt. Dies macht einen kausativen Defekt im Immunsystem bzw. der Selbst- und Fremderkennung immunkompetenter Zellen wahrscheinlich.

1.1.8 Diagnostik der HNA

Die Diagnostik der HNA erfolgt nach anamnestischen, klinischen und elektrophysiologischen Kriterien unter Ausschluß der wenigen differentialdiagnostisch zu erwägenden Erkrankungen (siehe hierzu 1.1.9, Differenzialdiagnosen der HNA). Kuhlenbäumer et al. fassten 2000 die maßgeblichen Richtlinien zur Diagnostik der HNA zusammen (48).

1.1.8.1 Klinische Diagnostik der HNA

Die klinische Diagnostik erfolgt anhand der beschriebenen charakteristischen akuten Symptomatik mit der Abfolge initialer Schmerzen und nachfolgender, vorwiegend motorischer Defizite, besonders der Muskeln des proximalen

Armes und des Schultergürtels. Etwaige dysmorphe Zeichen sollten erfasst werden.

1.1.8.2 „Anamnestische“ Diagnostik der HNA

Bei der Anamnese sollten mehrere Kriterien unbedingt erfragt werden:

- Gab es charakteristische Triggerfaktoren, die der Episode vorangingen?
- Trat die Erkrankung in gleicher oder ähnlicher Weise bereits zuvor oder bei weiteren Familienangehörigen auf? Hierbei sollte gezielt nach Symptomen gefragt werden. Falls weitere Angehörige betroffen waren oder sind, sollte ein genauer Stammbaum erhoben werden. Der typische Vererbungsmodus ist autosomal dominant mit unvollständiger, ca. 90%iger Penetranz. Einzelerkrankungen ohne positive Familienanamnese können aber Folge von de novo Mutationen sein und stellen kein Ausschlußkriterium dar.

1.1.8.3 Elektrophysiologische Diagnostik der HNA

Elektrophysiologische Kriterien zur Diagnostik der HNA sind (48):

- Im EMG der betroffenen Muskeln Zeichen der Denervation (im akuten Stadium) bzw. der Reinnervation (im Verlauf).
- Verringerte Amplituden der Aktionspotentiale in betroffenen sensiblen bzw. motorischen Nerven.
- Leicht verringerte distale Nervenleitgeschwindigkeiten in betroffenen Nerven.

Diese Befunde sind zugleich hinweisend auf einen axonalen Schädigungsmechanismus. Der Nachweis einer generalisierten Neuropathie stellt ein Ausschlußkriterium für die Diagnose der HNA dar.

1.1.9 Differenzialdiagnosen der HNA

Es gibt nur wenige relevante Differentialdiagnosen der HNA:

- *Parsonage-Turner-Syndrom*: Das Parsonage-Turner-Syndrom, auch noch heute Neuralgische Amyotrophie oder Schulteramyotrophie genannt, ist eine sporadische Neuropathie des Plexus brachialis (77). Eine einzelne Episode ist klinisch nicht zu unterscheiden von einer einzelnen HNA-Episode. Die Prognose ist, ähnlich wie die der HNA, sehr gut. Im Vergleich zur HNA jedoch liegt das Durchschnittsalter bei Erstmanifestation etwa 10 Jahre höher, die Zahl wiederholter Episoden ist niedriger und eine positive Familienanamnese fehlt.
- *Hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckparesen (HNPP)* (MIM 162500), auch genannt Tomakulöse Neuropathie: Die HNPP ist neben der HNA die zweite Entität, die hereditäre, episodische, Plexus-brachialis-Läsionen verursacht. Sie wird autosomal dominant vererbt. Der kausative genetische Defekt liegt bei ca. 85% der Patienten in einer 1,5Mb-Deletion auf Chromosom 17p11.2, die das Gen für „peripheral myelin protein 22“ (PMP22) enthält. Selten werden auch Punktmutationen im PMP22-Gen gefunden.

Die HNPP ist eine demyelinisierende Erkrankung und führt zu charakteristischen wiederkehrenden Episoden schmerzloser fokaler Neuropathien, denen in der Regel kleinere Traumata oder Kompressionen peripherer Nerven an typischen Engstellen vorausgehen (118). In einigen Fällen konnten residuale Plexus-brachialis-Läsionen als einziges Merkmal einer HNPP gefunden werden (73, 102). Diese sind in Abgrenzung zur HNA jedoch immer schmerzlos.

Elektrophysiologisch finden sich Zeichen generalisierter Neuropathie. Biopsien des N. suralis zeigen segmentale De- und Remyelinisierung mit lokal verdickten Myelinscheiden, die Tomakula genannt werden und der HNPP ihren zweiten Namen (Tomakulöse Neuropathie) verliehen. Zur Differenzialdiagnose der HNPP zur HNA siehe Tab.1.

| | Hereditäre Neuralgische Amyotrophie | Parsonage-Turner-Syndrom | Hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckpareisen |
|-------------------------------------|--|---------------------------------|---|
| Familienanamnese | Positiv | Negativ | Positiv |
| Alter bei Erstmanifestation | 2. und 3. Lebensdekade | 3. und 4. Lebensdekade | 2. und 3. Lebensdekade |
| Zahl der Episoden | Hoch | Niedrig | Hoch |
| Schmerzhaftigkeit | Immer, stark | Immer, stark | Nie |
| Zeichen generalisierter Neuropathie | Keine | Keine | Vorhanden |
| Prädilektion | Plexus brachialis | Plexus brachialis | Engpässe peripherer Nerven, aber teils auch Plexus brachialis |
| Dysmorphien | Möglich | Keine | Keine |

Tab.1: Differentialdiagnostische Kriterien von HNA, Parsonage-Turner-Syndrom und Hereditärer Neuropathie mit Neigung zu Druckpareisen.

1.1.10 Therapie der HNA

Prinzipiell werden bei der Therapie der HNA zwei Ziele verfolgt:

- *Schmerztherapie:* Bereits 1960 schilderte Taylor eine Schmerzerleichterung nach kurzer Kortisonbehandlung (104). Poffenbarger berichtete 1968 sogar eine starke Verbesserung der Schmerzsymptomatik nach Prednisongabe (82). Seither wurden diese Beobachtungen allerdings nicht bestätigt. Gute Erfolge beschrieben van Alfen et al. 2000 mit einer Kombination aus Opiaten und nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAP) im akuten Stadium. In Fällen chronischer Schmerzen empfehlen sie eine Kombination von NSAP mit Amitryptilin oder Benzodiazepinen (108).
- *Therapie der neurologischen Defizite:* Da die genaue Ätiologie der HNA ungeklärt ist, kann es zur Zeit keine spezifische, ursachenbezogene Therapie

geben. Aufgrund der wahrscheinlichen autoimmunen Genese wurden schon früh Therapieversuche mit verschiedenen Kortikoiden unternommen, die stark abweichende Erfolge zeigten:

Keine oder unwesentliche Effekte beobachteten: Roger et al., Poffenbarger, Smith et al. sowie Guillozet et Mercer (33, 82, 88, 97).

Eine Besserung der Symptome hingegen beschrieben Warot et al. nach Prednison (111) und Klein et al. nach Methylprednisolon (42). Geiger schilderte eine mäßige Verbesserung des Verlaufs nach hohen Dexamethason Dosen und deutlich schnellere Erholung als normal nach hohen Prednison Dosen (29).

1.1.11 Genetik der HNA

Alle bislang beobachteten HNA-Familien zeigen einen autosomal-dominanten Erbgang mit sehr hoher Penetranz (>90%).

1.1.11.1 Kopplung von HNA und Hypotelorismus

Bereits 1983 führten Arts et al. eine Linkage-Analyse mit verschiedenen Marker-Systemen (u.a. HLA- und Blutgruppenmarker) durch. Der Versuch, eine klare Kopplung zwischen HNA und Hypotelorismus nachzuweisen, mißlang jedoch. Lediglich moderate Hinweise auf eine Kopplung mit einem Lod-Score von 1,65 bei einer Rekombinationshäufigkeit von 12,5% wurden gefunden.

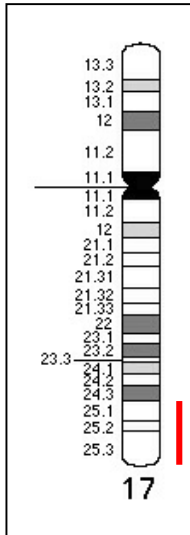
1.1.11.2 Kopplung auf Chromosom 17q25

Ab 1996 wurde der HNA-Lokus mittels Linkage-Analysen zunehmend auf Chromosom 17q25 eingegrenzt:

Nachdem Pellegrino et al. 1996 30% des Genomes anhand von zwei HNA-Familien ausgeschlossen hatten, fanden sie eine Kopplung von vier short-tandem-repeat (STR)-Markern auf Chromosom 17q24-q25 (79).

Dieser Locus konnte kurz darauf von Stögbauer et al. anhand einer großen türkischen Familie bestätigt und sogar auf 16cM verfeinert werden (103).

Ungefähr zeitgleich bestätigten auch Wehnert et al. den Lokus auf 17q24-q25 anhand einer Familie (113).



Unter Verwendung multipler DNA-Marker des distalen Chromosoms 17q studierten Pellegrino et al. 1997 sechs weitere HNA-Familien. Die Ergebnisse bestätigten den genannten Lokus in allen Familien, und zudem konnte die Kandidatenregion weiter auf Chromosom 17q25 eingeschränkt und zwischen die flankierenden Marker D17S1603 und D17S802 lokalisiert werden (78).

Abb.4: Ideogramm von Chromosom 17. Die Region 17q25 ist rot markiert.

1999 führten Meuleman et al. eine weitere Kopplungsanalyse mit STR-Markern an fünf HNA-Familien verschiedenen geographischen Ursprungs durch, deren Ergebnisse den HNA-Lokus weiter auf ca. 3,5cM reduzierten (siehe Abb.5), (63).

Van Alfen et al. konnten 2000 den Lokus an einer HNA-Familie mit klassischem Verlaufstyp bestätigen. An einer anderen Familie mit chronisch-undulierendem Verlauf jedoch schlossen sie die Kopplung mit Chromosom 17q25 aus (108). Die aktuelle Kandidatenregion auf Chromosom 17q25 beträgt somit 3,5cM (siehe Abb. 5).

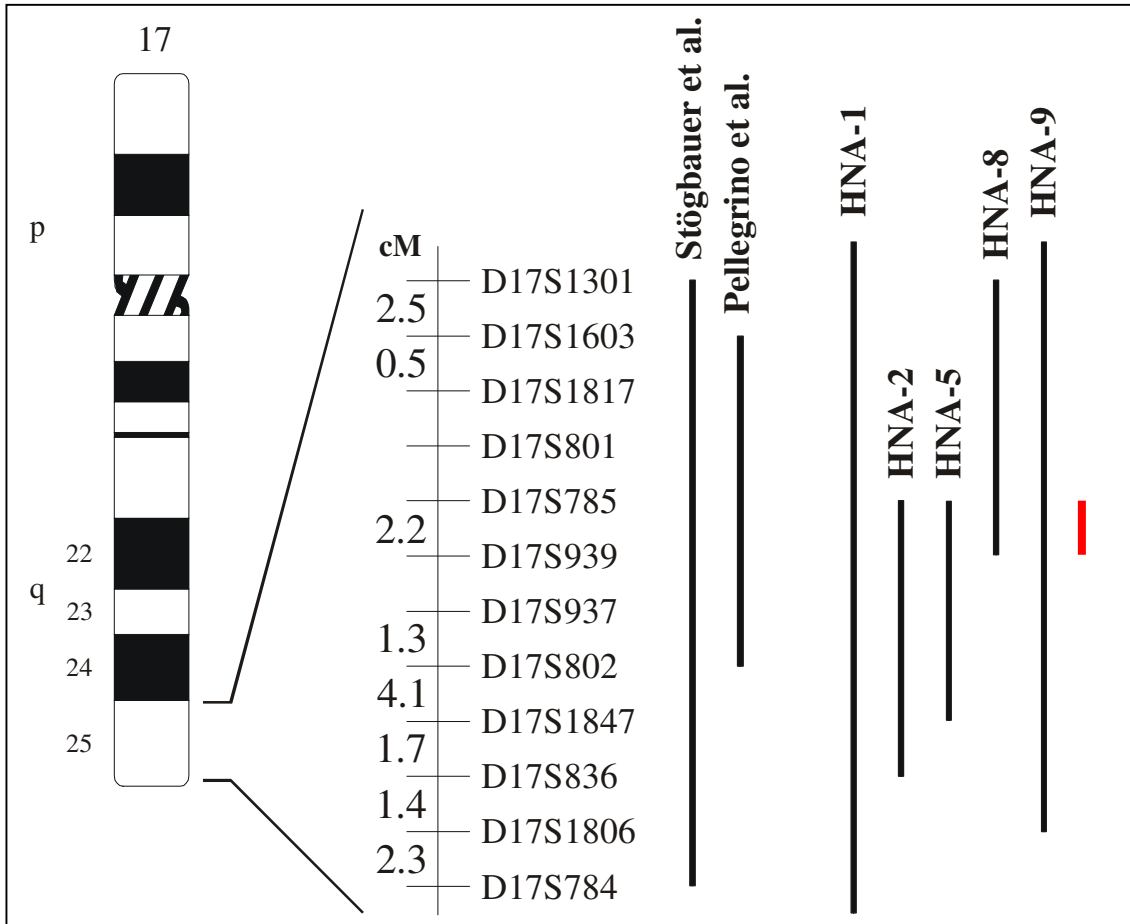


Abb.5: Ideogramm des Chromosom 17 mit den verwendeten STR-Markern. Die schrittweise Reduktion des HNA-Lokus wird rechts dargestellt. Die linke vertikale Linie symbolisiert die die Ergebnisse von Stögbauer et al. (103). Die folgende Linie symbolisiert die Ergebnisse von Pellegrino et al., 1997 (78). Die weiteren Linien symbolisieren die Resultate von Meuleman et al., 1999 (63). Die aktuelle Kandidatenregion ergibt sich aus dem minimal überlappenden Bereich (rote vertikale Linie).

1.1.11.3 Non-Linkage auf Chromosom 17q25

Wie bereits im letzten Kapitel erwähnt, schlossen Van Alfen et al. an einer HNA-Familie mit chronisch-undulierendem Verlaufstyp eine Kopplung auf Chromosom 17q25 aus, womit sie erste Hinweise auf eine genetische Heterogenität der HNA fanden (108).

Sowohl Kuhlenbäumer et al. als auch Watts et al. konnten 2001 an je zwei Familien mit klassischem Verlaufstyp eine Kopplung auf Chromosom 17q25 ausschließen und somit die genetische Heterogenität der HNA (46,112).

Beachtenswerterweise weist allerdings keine dieser bisher publizierten fünf Familien dysmorphe Zeichen auf. Dies weist darauf hin, dass HNA und Dysmorphien durch unterschiedliche Mechanismen verursacht werden, die zwar gemeinsam auf Chromosom 17q25 lokalisiert sind, aber rekombinieren können.

1.2 Kandidatengene

Die Region, in der die Kandidatengene für die HNA lokalisiert sein müssen, wurde unter 1.1.11.2, Kopplung auf Chromosom 17q25, beschrieben.

1.2.1 Bisherige Kandidatengene

Bereits 1998 wurden von Kuhlenbäumer et al. in zwei Familien mehrere Kandidatengene mittels direkter Sequenzierung ausgeschlossen: Dies waren das damals noch mutmaßliche Gen *Sialyltransferase SThM* sowie das Gen *splicing factor SFRS2* und der *c-myb ET-locus* (45).

1999 wurde dann von Kalikin et al. eine physikalische Karte der humanen Chromosomenregion 17q24-proximal17q25 veröffentlicht, die unter anderem acht bekannte Gene (*GALR2*, *AANAT*, *ENVL*, *SFRS2*, *SEC14L*, *DNAH17*, *API4*, and *TK1*) umfasste (40).

Kuhlenbäumer et al. erstellten im gleichen Jahr ein Contig mit ungefähr 1,5Mb Länge von Chromosom 17q25, das unter anderem fünf bekannte Gene enthielt (*ATF4C*, *SIAT7B*, *SFRS2*, *SEC14L1*, *TK1*) (47).

Mittels direkter Sequenzierung wurden 2001 von Meuleman, Kuhlenbäumer et al. vier Gene (*MSF*, *TK1*, *ST6GalNAcI* und *SEC14L1*), die sich alle auf dem genannten Contig und somit in der Kandidatenregion abbilden, als Kandidatengene für HNA ausgeschlossen (62).

1.2.2 Aktuelle Kandidatengene

Für die vorliegende Arbeit wurden drei Gene ausgewählt, deren Funktion und potentielle Rolle für die Auslösung der HNA nachfolgend sowie im Kapitel „Diskussion“ erläutert werden:

Sphingosinkinase-1 (SPHK-1) – Gen

Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2) – Gen

Lymphocyte activated killer cells (LAK)-4P – Gen

Abb.6 verdeutlicht ihre ungefähre Position auf Chromosom 17q25.

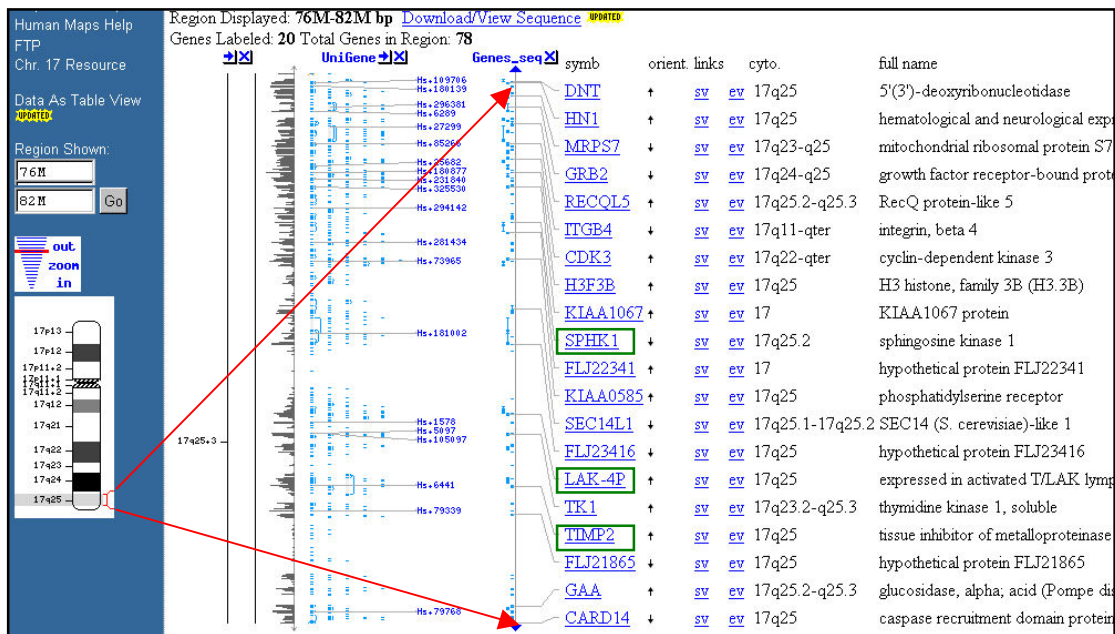


Abb.6: Physikalische Karte eines Teils von Chromosom 17q25 mit Darstellung der bekannten Gene, darunter die gewählten Kandidatengene *SPHK-1*, *LAK-4p* und *TIMP2* (grün umrahmt).

Einen Überblick zu den gewählten Kandidatengenen gibt Tabelle 2.

| Name des Gens | Abkürzung | Accession number und Position der kodierenden Sequenz | Zahl der Exone | cDNA-Länge (bp) | Zahl der AA | Zugehöriger BAC-Klon |
|---|---------------|---|----------------|-----------------|-------------|--------------------------------------|
| <i>Sphingosine kinase 1</i> | <i>SPHK 1</i> | AF266756 (c): KS 270..1424 | 5 | 1693 | 384 | BAC- AC068145 |
| <i>Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i> | <i>TIMP2</i> | NM_003255 (c): KS 303..965 | 4 | 1075 | 220 | BAC- AC022966 BAC- AC025609 |
| <i>LAK-4P: expressed in activated T/LAK lymphocytes (interim)</i> | <i>LAK-4P</i> | AB002405 (c) KS 53..1387 | 12 | 1639 | 444 | BAC- AL096808 |

Tab.2: Ausgewählte Kandidatengene für HNA auf Chromosom 17q25.

Der Überblick beinhaltet die Namen der Gene, ihre Abkürzungen, die Accession number bei GenBank (c=cDNA), die Position der kodierenden Sequenz (KS), die Zahl der Exone, die Länge der cDNA in Basenpaaren (bp) und den zugeordneten Bac-Klon.

1.2.2.1 Homo Sapiens Sphingosinkinase-1 (SPHK-1) - Gen

1.2.2.1.1 Lokalisation des SPHK-1-Gens

Das Gen für Sphingosinkinase-1 (*SPHK-1*) (GenBank accession number AF266756) ist auf dem Bac-Klon AC068145 lokalisiert (siehe Abb.7).

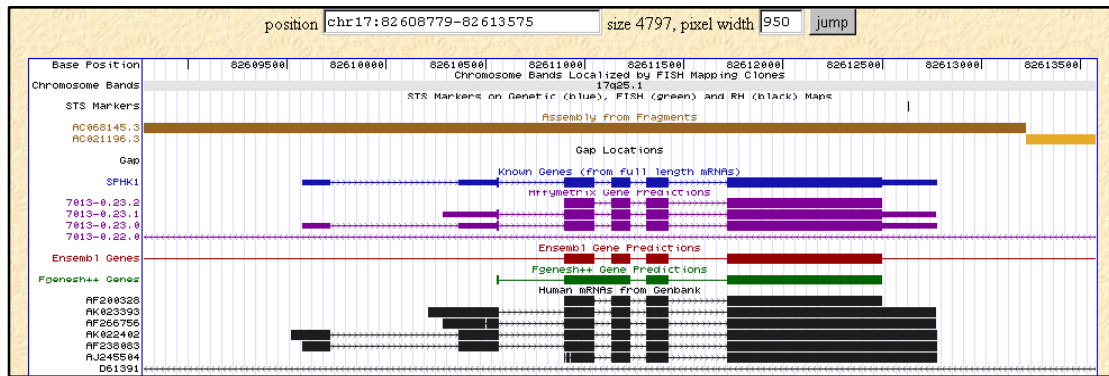


Abb.7: Darstellung der Position von *SPHK-1* auf dem Bac-Klon AC068145

1.2.2.1.2 Molekulare Klonierung und Charakterisierung von SPHK-1

Kohama et al. konnten 1998 eine murine SPHK molekular klonieren und funktionell charakterisieren. Sie bestimmten eine mutmaßliche humane Sequenz der SPHK, indem sie Sequenzen mehrerer Expressed Sequence Tags (ESTs) zusammenfügten, die Homologien mit der von ihnen charakterisierten murinen SPHK aufwiesen (44).

Im Jahr 2000 wurde die humane SPHK-1 dann von Melendez et al. molekular geklont, funktionell charakterisiert und auf ihre Gewebsexpression untersucht (61).

Die Sichtung von Datenbanken zeigt, dass zahlreiche Homologien von SPHK im Tierreich bei sehr verschiedenen Spezies vorkommen. Dies läßt auf eine hochkonservierte Genfamilie schließen (44). Der Vergleich vorhergesagter Aminosäuresequenzen bekannter SPHK-Homologe zeigte als Gemeinsamkeit fünf Blöcke hochkonservierter Aminosäuren (44). Diese Blöcke finden sich auch in mehreren Expressed Sequence Tags (dbEST) wieder, deren restliche Sequenz von der des *SPHK* abweicht. Dies wiederum weist auf eine Reihe von SPHK-Isoformen hin. Eine davon, SPHK2, wurde kürzlich molekular geklont und funktionell charakterisiert (55).

1.2.2.2 Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)-Gen

1.2.2.2.1 Lokalisation des TIMP2-Gens

Das Gen für *Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)* (GenBank accession number NM_003255) ist auf den Bac-Klonen AC022966 und AC025609 lokalisiert (siehe Abb. 8).

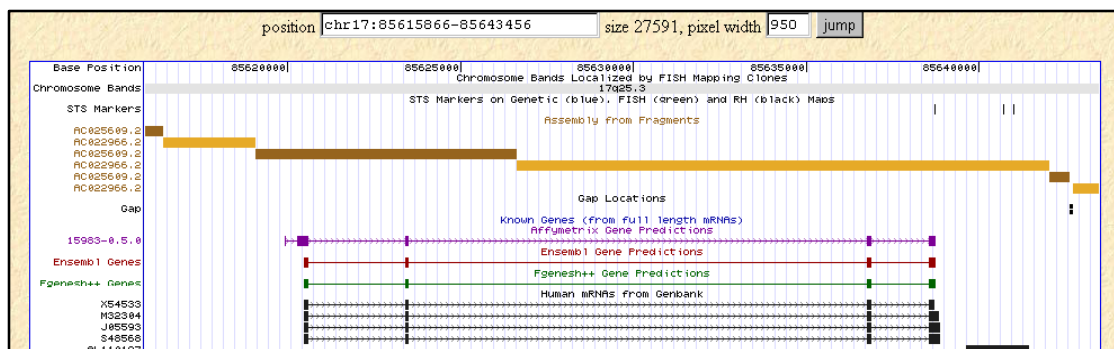


Abb.8: Darstellung der Position von *TIMP2* auf dem Bac-Klon AC025609

1.2.2.2.2 Molekulare Klonierung und Charakterisierung von TIMP2

Stetler-Stevenson et al. berichteten 1989 über die Aufreinigung und Sequenzierung eines Proteins namens CSC-21K, das von humanen Melanomzellen sezerniert wird (100). Beim Vergleich der Aminosäuresequenz ergaben sich signifikante Homologien mit dem bis dato bekannten humanen TIMP. Stetler-Stevenson et al. konnten weiterhin nachweisen, dass die Zugabe von CSC-21K zu aktivierter Matrixmetalloproteinase (MMP) in einer Hemmung der kollagenolytischen Aktivität resultierte. Daher postulierten sie die Existenz einer TIMP-Familie, der sie CSC-21K zuordneten und schlugen für CSC-21K den Namen TIMP2 vor.

Osthues et al. isolierten und charakterisierten 1992 erstmals TIMP-1 und TIMP2 aus humaner rheumatoider Synovialflüssigkeit (74). Mittels Immunoblotting wiesen sie die Komplexbildung zwischen den TIMPs und Leukozyten-MMPs nach.

Ebenfalls 1992 lokalisierten de Clerck et al. das Gen für TIMP2 mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Chromosom 17q25 (20).

Die Strukturbeschreibung und Charakterisierung des TIMP2-Gens erfolgte schließlich 1996 durch Hammani et al. (34).

1.2.2.3 Lymphocyte activated killer cells (LAK)-4P - Gen

1.2.2.3.1 Lokalisation des LAK-4P-Gens

Das Gen für *Lymphocyte Activated Killer Cells (LAK)-4P* (GenBank accession number AB002405) befindet sich auf dem Bac-Klon AL096808 (siehe Abb.9).

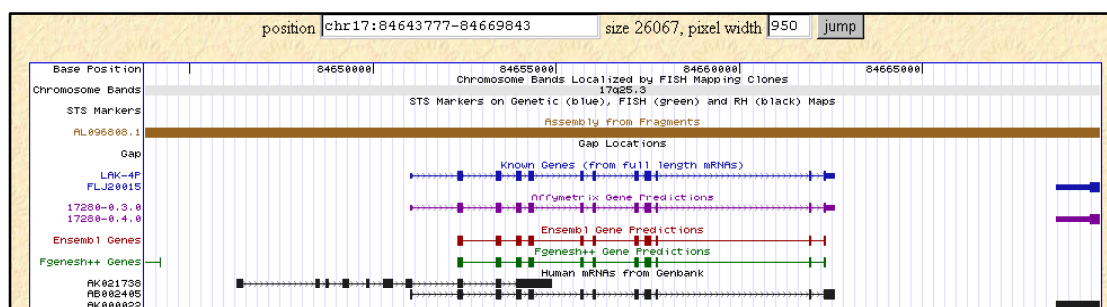


Abb.9: Darstellung der Position von *LAK-4P* auf dem Bac-Klon AL096808

1.2.2.3.2 Sequenzierung und Expression von *LAK-4P*

Die erste Sequenzversion von *LAK-4P* wurde 1997 von Abe und Takaoka bei den Datenbanken von DDBJ/EMBL/GenBank eingereicht und 2000 durch eine zweite, noch aktuelle Version ersetzt (AB002405). Sie beschrieben eine verstärkte Expression von *LAK-4P* im lymphoiden Gewebe des Menschen im Zusammenhang mit der Aktivierung von T- und LAK-Zellen (2). Darüber hinaus existiert keine weitere Veröffentlichung zu *LAK-4P*. Seine weitere Lokalisation, Expression und Funktion sind somit vollkommen unbekannt.

1.3 Fragestellung

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind wie folgt:

- Wie ist die genomische Organisation der untersuchten Gene?
- Finden sich Mutationen in den untersuchten Genen?
- Wie sind die detektierten Mutationen funktionell zu bewerten?
- Stehen die detektierten Mutationen in pathogenetischem Zusammenhang zur HNA?
- Lassen sich die untersuchten Gene als Kandidatengene für die HNA ausschließen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Patientenfamilien

Es wurden in der vorliegenden Arbeit Angehörige von vier Familien untersucht, in denen Familienmitglieder in mehreren Generationen an HNA erkrankt sind. Die Betroffenen wurden mittels der diagnostischen Richtlinien für HNA (48) charakterisiert. Diese umfassen den autosomal-dominanten Vererbungsmodus, die klinische Symptomatik, den Verlauf sowie die Kopplung auf Chromosom 17q25.

Die Patienten erklärten sich mit der klinischen Untersuchung sowie der Gewinnung von Blutproben zur weiteren genetischen Charakterisierung einverstanden.

Insgesamt wurde die DNA von sechs Personen aus den genannten vier Familien zum initialen Screening mittels Mutationsanalyse verwendet. Davon waren, wie im Verlauf beschrieben, zwei gesund und vier an HNA erkrankt.

Die vier Familien werden im Folgenden näher beschrieben (die zugehörigen Stammbäume sind in den Abbildungen 10-13 dargestellt):

2.1.1.1 Familie HNA-2:

Zum Stammbaum siehe Abb. 10.

Die türkische Familie HNA-2 wurde bereits 1997 von Stögbauer et al. beschrieben. 42 Angehörige, davon 14 Betroffene, wurden zur Linkage-Analyse auf Chromosom 17q24-q25 verwendet (103). 1999 wurden dann zwei weitere Angehörige, HNA2IV20 und HNA2IV21, von Meuleman et al. einbezogen und

zur verfeinerten Kopplungs-Analyse verwendet (63), mittels derer die Kandidatenregion auf Chromosom 17q25 eingegrenzt werden konnte.

Ein Arm der Familie, nämlich die Person HNA2II5 sowie dessen Kinder und Enkelkinder zeigen Kleinwüchsigkeit. Weitere dysmorphe Zeichen sind in der Familie HNA-2 nicht nachweisbar.

Aus der Familie HNA-2 wurden zwei Individuen als Referenzpersonen zur Mutationsanalyse verwendet: Als Erkrankte die Person HNA2IV19 und als Nichterkrankte die angeheiratete Person HNA2III18.

2.1.1.2 Familie HNA-8:

Zum Stammbaum siehe Abb. 11.

HNA-8 ist eine spanische Familie, die von Prof. Pou-Serradell (Universität Barcelona, Spanien) rekrutiert wurde. 22 Angehörige, davon sieben Betroffene, wurden 1999 von Meuleman et al. in einer Kopplungs-Analyse auf Chromosom 17q25 verwendet (63).

Verschiedene dysmorphe Zeichen sind in der Familie HNA-8 mit der HNA assoziiert: Bis auf die Person HNA8II2 zeigen alle Erkrankten einen Epikanthus. In dieser Gruppe der Personen mit Epikanthus wiederum weisen alle bis auf Person HNA8III1 zusätzlich einen Hypotelorismus auf. Lediglich eine Person, HNA8II9, zeigt dysmorphe Zeichen, nämlich Epikanthus, Hypotelorismus sowie eine Gaumenspalte, ohne jemals eine HNA-Episode erlitten zu haben.

Aus der Familie HNA-8 wurde die erkrankte Person HNA8III10 als Referenzperson zur Mutationsanalyse verwendet.

2.1.1.3 Familie K4003:

Zum Stammbaum siehe Abb.12.

In der Familie K4003 wurde bereits 1996 von Pellegrino et al. an 28 Individuen eine Kopplungs-Analyse durchgeführt (79).

Von diesen 28 Personen waren 17 an HNA erkrankt. Alle Erkrankten zeigen leichte dysmorphe Zeichen mit Hypotelorismus, Epikanthus und langem Nasenrücken. Darüberhinaus zeigen auch die Personen 15 und 41 dysmorphe Zeichen, ohne bisher eine HNA-Episode erlitten zu haben. Möglicherweise haben auch sie daher das Krankheitsrisiko geerbt und stellen Beispiele der unvollständigen Penetranz dar.

Aus der Familie K4003 wurden die Personen 30 und 31 als Referenzpersonen zur Mutationsanalyse verwendet. K4003-31 ist erkrankt, während K4003-30 als gesunde Familienangehörige zur Negativkontrolle mitgeführt wurde.

2.1.1.4 Familie K4004:

Zum Stammbaum siehe Abb.13.

Die Familie K4004 wurde bereits 1974 von Geiger et al. als Familie „S“ beschrieben (29). In der Folge wurden 14 Personen der Familie, davon sieben Betroffene, von Pellegrino et al. zur Kopplungs-Analyse auf Chromosom 17q25 verwendet (78).

Mehrere Betroffene zeigen Hypotelorismus und zwei Erkrankte eine Gaumenspalte.

Aus der Familie K4004 wurde die Person 14 als erkrankte Referenzperson zur Mutationsanalyse verwendet.

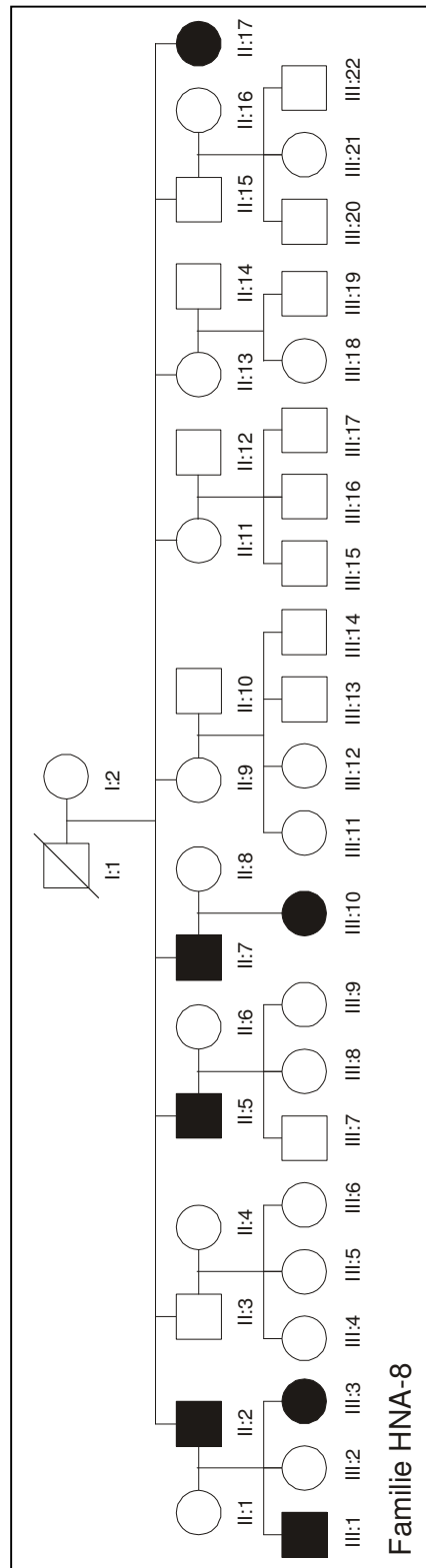
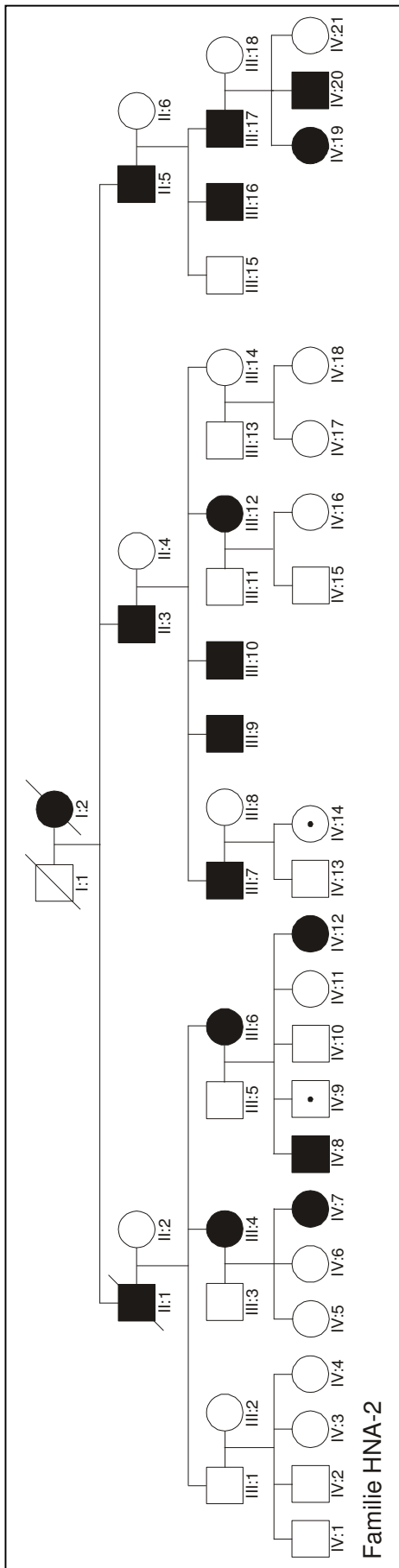


Abb.11: Familie HNA-8

Abb.10: Familie HNA-2

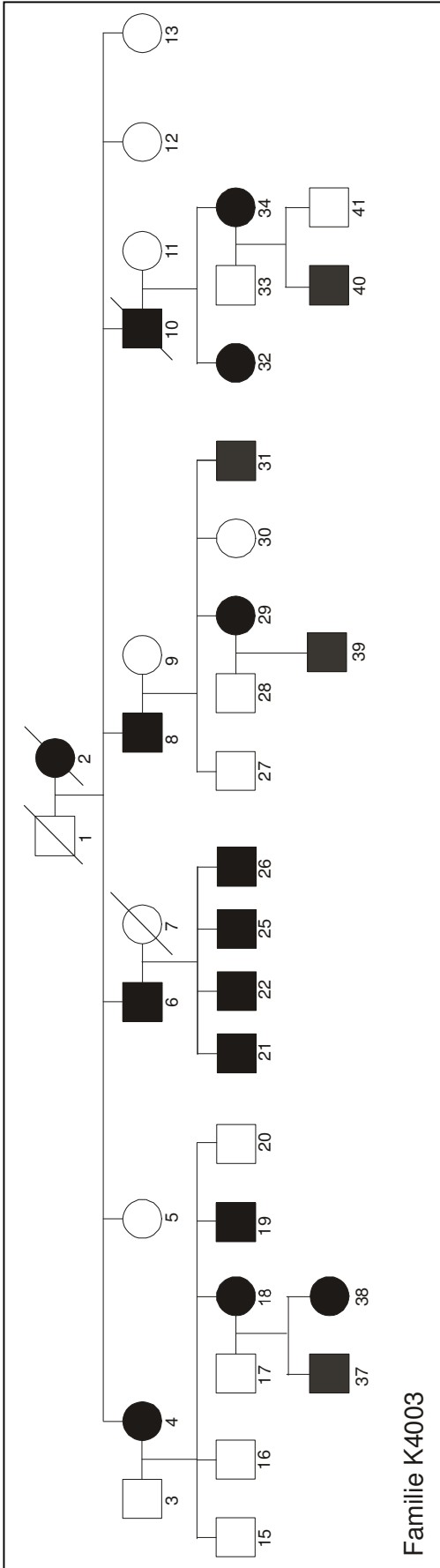


Abb.12: Familie K4003

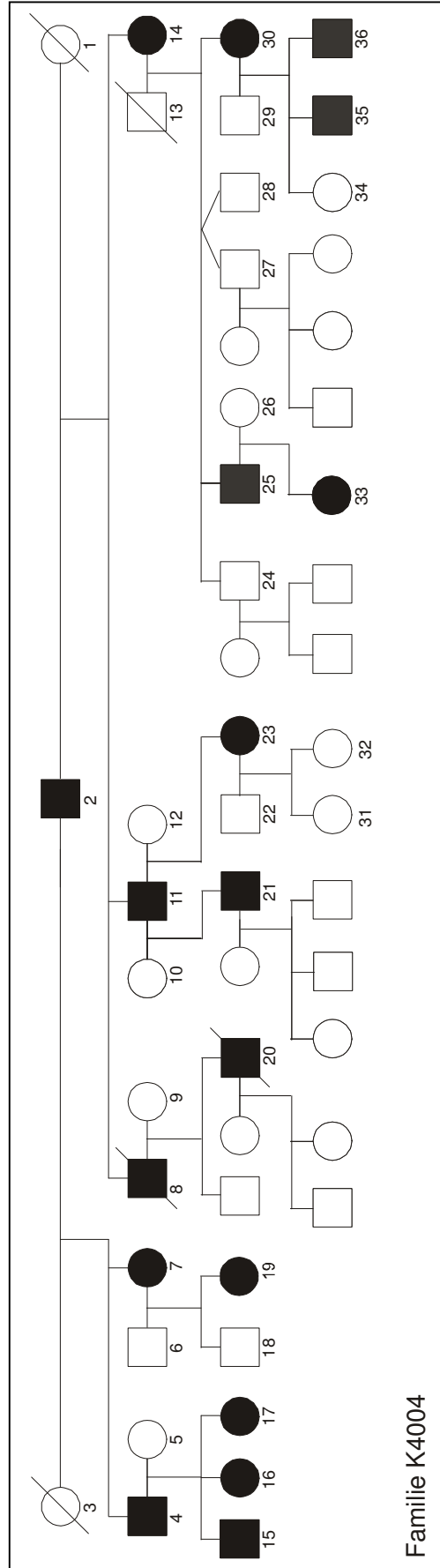


Abb.13: Familie K4004

Die verwendeten Referenzpersonen aus den beschriebenen vier Familien werden in Tab. 3 noch einmal aufgeführt.

| Patient | Familie | Status |
|-----------|---------|-----------|
| HNA8III10 | HNA8 | Betroffen |
| HNA2IV19 | HNA2 | Betroffen |
| HNA2III18 | HNA2 | Gesund |
| 4003-30 | 4003 | Gesund |
| 4003-31 | 4003 | Betroffen |
| 4004-14 | 4004 | Betroffen |

Tab.3: Verwendete Referenzpersonen aus vier HNA-Familien

2.1.2 Kontrollpersonen

Bezüglich der Kontrollen wurde so vorgegangen, dass die ermittelten Ergebnisse in gestaffelter Weise hinsichtlich ihrer Bedeutung für die HNA an Negativkontrollen überprüft wurden:

Hierbei wurden zunächst jeweils 18 gesunde deutsche Blutspender verwendet, zwischen denen keine verwandtschaftliche Beziehungen bestanden. Die Zahl der Kontrollen wurde sodann in Abhängigkeit der Befunde weiter gesteigert.

Im Falle exonischer Sequenzvariationen wurden die Ergebnisse zusätzlich an UniGene Clustern abgeglichen. Die dort enthaltenen ESTs sind anonyme Daten.

Als weiterer Schritt wurde im Falle einer Mutation im Gen LAK-4p an Stelle c.504-4 in der spanischen Familie HNA-8 eine Kontrolluntersuchung an 50 gesunden spanischen Personen durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich bei dem Befund um einen ethnisch bezogenen Polymorphismus handeln könnte. Die DNA dieser Personen wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Pou-Serradell (Universität Barcelona, Spanien) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparation

DNA wurde auf zwei Arten gewonnen: 1) Die DNA der oben beschriebenen Referenzpatienten wurde mittels einer Standard-Präzipitationsmethode (65) aus EBV-transformierten Lymphozyten gewonnen und freundlicherweise von der kooperierenden Arbeitsgruppe um Frau Prof. C. Van Broeckhoven (Department of Biochemistry, University of Antwerp, Antwerpen, Belgien) zur Verfügung gestellt. 2) Die weitere eingesetzte DNA wurde aus 10ml EDTA-Vollblut gewonnen. Hierfür wurde das QIAamp® DNA Blood Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) mit dem zugehörigen Protokoll verwendet. Die im EDTA-Blut enthaltenen Zellen wurden zunächst durch Zugabe von QIAGEN Protease (Proteinase K, 20 mg/ml) nebst einem Puffer während einer zehnmütigen Inkubationszeit bei 70 °C lysiert. In der Folge wurde das Lysat über eine im Kit enthaltene Säule aufgereinigt. Dabei wurde die freie DNA nach Angaben des Herstellers an die Silikaoberfläche der Säule gebunden. Nach weiteren Waschschritten wurde sie dann in einer Pufferlösung (10mM Tris-Cl, 0,5mM EDTA; pH 0,9) eluiert. Abschließend wurde die DNA-Konzentration über photometrische Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm als dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bestimmt. Vor Beginn der Messung wurde ein Nullabgleich mit H₂O durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde mit HPLC-H₂O auf 50ng/µl verdünnt.

2.2.2 Genomische Charakterisierung

Die humanen cDNA-Sequenzen des jeweiligen zu untersuchenden Gens wurden mittels GenBank (13), einer Einrichtung des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). Zur Identifizierung der zugehörigen genomischen Klone sowie der Exon-Intron-Struktur wurden die humanen cDNA-Sequenzen mittels des "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST®)-Programms.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; (4) mit der "high throughput genomic sequence" ("htgs")- und der "non-redundant" ("nr")-Datenbank humaner genomischer DNA verglichen und auf die gefundenen Sequenzen der korrespondierenden genomischen Klone projiziert. Alternativ bzw. bei Bekanntheit der zugehörigen genomischen Klone wurden die Programme SIM4 (<http://biom3.univ-lyon1.fr/sim4.html>; (27) und BLAST 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) benutzt. Die resultierenden Einzelstücke, also Exone wurden mittels des Programmes EditSeq® (DNA-Star Inc., Madison, WI, USA) gespeichert und später zum Primerdesign verwendet.

2.2.3 Mutationsanalyse

2.2.3.1 Primer-Konstruktion

Primer flankieren bei der PCR die zu amplifizierende DNA-Region und stellen die von der DNA-Polymerase für die DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung benötigten freien 3'-OH-Gruppen zur Verfügung. Die Spezifität der Primer wird von deren Länge, Schmelztemperatur (T_m-Wert), Selbst- und 3'-Komplementarität, CG-Gehalt und Gehalt an Mononukleotid-Repeats bestimmt.

Die Primer wurden so gestaltet, dass sie die jeweiligen Exone zuzüglich angrenzender 30-50 Basen im intronischen Bereich flankierten. So wurde sichergestellt, dass die für das Spleißen wichtigen Strukturen „splice-site“ und „branch-site“ der Mutationsanalyse zugänglich wurden.

Für das Design der Primer wurde das Programm „Primer3®“ (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi; (89) benutzt.

Für die Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) wurden die Größe der Fragmentlängen zwischen 215bp und 290bp gewählt, da die optimale Sensitivität bei PCR-Produktgrößen von 150 bp bis 300 bp liegt (49, 96).

Die erstellten Primersequenzen werden aus den Tab.5, Tab.10 und Tab.13 ersichtlich.

Die Primer wurden als HPSF® („high purity salt free“)-Oligonukleotide kommerziell von der MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Zur Verwendung in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden die Primer mit HPLC-H₂O auf eine Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt.

2.2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine in-vitro Technik, mit der sich eine zwischen zwei Oligonukleotid-Primern liegende genomische Sequenz spezifisch durch eine DNA-Polymerase amplifizieren lässt (90, 91). Die DNA-Matrize wird unter Zugabe von Oligonukleotid-Primern, dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase in einer Primerverlängerungsreaktion („primer extension“) von 25-30 Zyklen auf das 10⁵-fache vervielfältigt. Nach Denaturierung der dsDNA bei 94 °C in Einzelstränge werden zunächst ‚Sense‘- und ‚Antisense‘-Oligonukleotide bei optimaler Anlagerungstemperatur („annealing temperature“) als Primer an die denaturierte ssDNA hybridisiert. Die Temperatur wird daraufhin auf 72 °C erhöht und die Primer werden entlang der DNA-Matrize durch eine Polymerase in Gegenwart aller vier dNTPs verlängert, wodurch es zur Synthese von Kopien des primerflankierten Bereiches in doppelsträngiger Form kommt. Mit der Denaturierung in Einzelstränge bei 94 °C beginnt ein neuer Zyklus.

Standard PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 μl enthielten 5 μl 10xPCR-Puffer®, 0,25 μl HotStarTaq®-DNA-Polymerase (5U/μl) (alle Qiagen GmbH, Hilden), 1 μl 10mM dNTP-Mix (Eppendorf GmbH, Hamburg), jeweils 2 μl F/R Primer (10 pmol/μl), 36,75 μl HPLC-H₂O und 3 μl DNA (50ng/μl) verwendet.

Für die Primer folgender Exone gelang die PCR ausschließlich unter Zugabe von Q-Solution® (Qiagen GmbH, Hilden): SPHK1-Exon1, SPHK1-Exon2, TIMP2-Exon3, LAK-4p-Exon3 und LAK-4p-Exon8-9. In diesen Fällen wurden, bezogen auf obiges Standard-Protokoll, 10 μl HPLC-H₂O durch 10 μl Q-Solution® ersetzt.

Um die optimale Anlagerungstemperatur („annealing temperature“) der Primer zu ermitteln, wurde für jedes Primerpaar zunächst eine Gradienten-PCR unter Verwendung von zwölf verschiedenen Anlagerungstemperaturen (45 °C - 65 °C) in einem PTC-200 DNA Engine Gradient Cycler® - PCR-Gerät (MJ Research, Waltham, MA, USA, durchgeführt.

Die Amplifikationsreaktion wurde sodann entweder in dem oben genannten PCR-Gerät oder einem einem PTC-200 DNA Engine® - PCR-Gerät (MJ Research, Waltham, MA, USA, unter Standard-PCR-Bedingungen ausgeführt (initial 15min bei 94 °C; sodann 30 Zyklen mit je: 30s bei 94 °C, 30s bei der jeweiligen optimalen Anlagerungstemperatur der Primer, 30-60s bei 72 °C; abschließend 10min bei 72 °C).

2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte lassen sich hinsichtlich der Größe, Konzentration und Spezifität der Amplifikationsreaktion mittels einer Gelelektrophorese überprüfen. In der Gelelektrophorese wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Gel unter angelegter Spannung in Richtung der Anode. Die zurückgelegte Laufstrecke ist bedingt durch den Molekularsieb-Effekt des Agarosegels umgekehrt proportional der Molekülgröße des Amplikons (1). Unter Einbau des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (1mg/ml) in den DNA-Doppelstrang kann das Fragment unter UV-Licht detektiert werden (95). Mit Hilfe eines Größenmarkers, der parallel auf das Gel aufgetragen wird, läßt sich die Größe des Amplikons bestimmen.

Zur Herstellung eines 1,5% Agarosegels für DNA-Partikelgrößen von 0,2 bis 3 kb wurden 7,5g SeaKem® LE Agarose (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) in 500ml 1xTBE durch Aufkochen gelöst. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 60 °C aufbewahrt. Pro gegossenem Gel wurden 7,5µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) verwendet. Zur Elektrophorese wurden Horizontal-Gel-Elektrophorese-Kammern (Harnischmacher Labortechnik, Arnsberg) mit 1xTBE als Elektrophoresepuffer verwendet.

Es wurden jeweils 3µl des PCR-Produktes mit 0,3µl Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt und bei 13V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente der 100bp DNA ladder Gene ruler® (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Zur Geldokumentation wurde ein UV-Licht-Kamerasystem verwandt (Multimage® Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA).

2.2.3.4 Einzelstrang-Konformations-Analyse (Single stranded conformational analysis, SSCA)

Einzelsträngige DNA-Fragmente mit geringfügigen Sequenzunterschieden lassen sich durch Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel voneinander unterscheiden. Ursache für diese sequenzabhängigen Mobilitätsunterschiede ist, dass durch primärstrukturabhängige Basenpaarungen innerhalb des Einzelstranges die Konformation der Tertiärstruktur und damit die elektrophoretischen Wanderungseigenschaften des Nukleinsäurepolymers beeinflusst werden. Einzelne Basensubstitutionen lassen sich somit im Vergleich zum Wildtyp an unterschiedlichen Bandenmuster erkennen (71).

Zunächst wurden die Glasplatten eines Multigel-Elektrophorese-Systems (Whatman Biometra®, Göttingen) mit Extran und 70% Ethanol gereinigt. Zwischen jeweils zwei durch Gummileisten abgedichtete Platten wurde daraufhin ein 10%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel (Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 49:1; 0,5xTBE; 100µl TEMED pro 100ml Ansatz, 100µl Ammoniumpersulfat pro 10ml Ansatz) gegossen und in polymerisiertem Zustand mit 0,5xTBE als Laufpuffer in vertikale Elektrophoresekammern (Whatman Biometra®, Göttingen) eingesetzt. Für die SSCA wurden 8µl PCR-Produkt zunächst mit 12µl eines Elektrophorese-Puffer-Gemisches (Formamid/Bromphenolblau-Ladepuffer im Verhältnis 6:1) versetzt, für 5 min bei 94 °C denaturiert und anschließend auf

Eis gekühlt. Die verwendeten Primer zur Durchführung der PCR gehen aus Tab. 3.3.2.1 hervor.

Jeweils 7µl des denaturierten PCR-Produkt/Puffer-Gemisches sowie 4µl des 100bp DNA ladder Gene ruler® (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) als Längenmarker wurden schließlich auf getrennte Laufspuren des Gels aufgetragen und bei zwei verschiedenen Bedingungen (Raumtemperatur bei 6V/cm und 4°C bei 7V/cm) elektrophoretisch über 12-16h aufgetrennt.

2.2.3.5 Silberfärbung

Nukleinsäuren, die in einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt wurden, lassen sich auf dem Gel mittels einer Silberfärbung sichtbar machen. Das Prinzip der Silberfärbung beruht auf einer durch Lichteinfall katalysierten chemischen Reduktion von ionischem zu metallischem Silber (11, 120).

Die Polyacrylamidgele wurden aus den Glasplatten gelöst und in einer 220x150x55cm³ Glasinstrumentenschale (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) auf einem Taumel-Wipptisch WT (Whatman Biometra®, Göttingen) 12min mit einer Schüttelfrequenz von 40/min nach folgendem Protokoll gefärbt: 5min – 10% Ethanol; 3min - 1% HNO₃; 10min - AgNO₃ (10g AgNO₃ , 5ml Formaldehyd ad 5000ml H₂O); 3 x 1min - aqua dest.; Fällungsreaktion mit Na₂CO₃ (150g Na₂CO₃, 2,5ml Formaldehyd ad 5000ml H₂O); Entwicklung mit Na₂CO₃ (150g Na₂CO₃, 2,5ml Formaldehyd ad 5000ml H₂O); 1min – 10% CH₃COOH. Die Gele wurden zwischen Filterpapier (Schleicher & Schuell GmbH, Einbeck) und Zellophan für 2,5h auf einem Geltrockner Maxidry D64 (40x60cm²) unter Anschluß einer Vakuumpumpe (Whatman Biometra®, Göttingen) getrocknet.

2.2.3.6 Sequenzierung

Die Lokalisation und die Art einer genetischen Variation lassen sich über DNA-Sequenzierung definieren. Direktes Sequenzieren basiert auf der Didesoxy-Ketten-Abbruch-Methode (92). Die DNA wird hier als einzelsträngige Matrize

unter Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Terminatoren („Dye Terminatoren“), die die einzelnen Nukleotide spezifisch markieren und jeweils zufällig zum Abbruch der Synthese führen, reamplifiziert. Während der Elektrophorese des Amplikons wird ein Laserstrahl konstant auf eine bestimmte Stelle des Gels fokussiert. Passieren die Nukleotid-spezifisch markierten DNA-Fragmente diese Stelle, regt der Laserstrahl die Farbstoffe zur Fluoreszenz an. In einem angeschlossenen Computer werden die gemessenen Wellenlängen der einzelnen Fluoreszenzmaxima aufgenommen und so die Sequenz des DNA-Fragmentgemischs rekonstruiert.

2.2.3.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zunächst wurde das jeweils zu sequenzierende Fragment unter Benutzung des zugehörigen Primerpaares (siehe Tab. 5, 10 und 14) in einer Standard-PCR-Reaktion mit einem modifizierten Endvolumen von 50 µl amplifiziert.

2.2.3.6.2 Aufreinigung des PCR-Produkts

Unter Verwendung des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) wurde das PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Hierbei wurde die amplifizierte DNA bei hoher chaotroper Salzkonzentration und einem pH<7,5 an eine Silika-Membran adsorbiert. Nach Auswaschen von Verunreinigungen mit einem ethanolhaltigen Puffer wurde die DNA mit Tris-Puffer (10mM Tris-Cl; pH 8,5) eluiert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel im Vergleich mit dem SmartLadder® (Eurogentec, Köln) als standardisiertem Längen- und Konzentrations-Marker bestimmt.

2.2.3.6.3 Sequenzierreaktion

Zur Markierung der DNA mit Fluoreszenz-Farbstoffen wurde das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Langen) verwendet,

das BigDye® Terminatoren für die einzelnen Nukleotide (dR110 BD/C, dR6G BD/A, dTAMRA BD/G, dROX BD/T) sowie AmpliTaq®-DNA-Polymerase enthält. Ein Standard-Ansatz mit einem Endvolumen von 10µl setzte sich wie folgt zusammen: 2µl BigDye®, 2µl Sequenzierpuffer (200mM Tris (pH 9,0) und 5mM MgCl₂), 0,5µl Primer, 50-100ng PCR-Produkt, H₂O ad 10µl. Die Sequenzierreaktion wurde in einem einem PTC-200 DNA Engine® - PCR-Gerät (MJ Research, Waltham, MA, USA) durchgeführt und umfasste 25 Zyklen (10s - 96°C; 10s - 55°C; 4min - 60°C). Da die verwendeten PCR-Produkte teilweise Längen über 500bp aufwiesen, und die Qualität der hergestellten Sequenzen ab ca. 500b stetig abnimmt, wurde im Einzelfall die Verwendung zusätzlicher interner Primer notwendig. Die hierbei verwendeten internen Primer sind wie auch die bereits für die PCR-Reaktion verwendeten Primer aus den Tab. 3.1.2.1, Tab.3.2.2.1 und Tab.3.3.2.1 ersichtlich.

2.2.3.6.4 Aufreinigung des Sequenzierreaktions-Produkts

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden unter Verwendung eines DyeEx® Spin Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers von nicht-inkorporierten BigDye® Terminatoren gereinigt. Dabei wurden BigDye® Terminator-Rückstände in den Poren des Gelfiltrationsmaterials einer vorbereiteten Säule retiniert. Die DNA wurde dann aus der Säule eluiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.2.3.6.5 Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse wurde zunächst ein 4,8%iges denaturierendes Polyacrylamidgel angesetzt. Hierzu wurden 18g Urea in 26,5ml HPLC-H₂O mit 5ml 10xTBE und 6ml 40%iger PAGE plus® Lösung (AMRESCO, Solon, USA) aufgelöst und nach Vakuumfiltration mit 300µl Ammoniumpersulfat und 20µl TEMED versetzt. Nach Gießen der Polyacrylamidlösung zwischen zwei Glasplatten (38x43cm² Gelgröße, 2mm Geldicke; Applied Biosystems, Weiterstadt) und Polymerisation des Gels wurden die Platten in ein

automatisches Sequenziergerät ABI 377® (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt.

Die aufgereinigten und verdunsteten Sequenzierprodukte (siehe 2.3.6.4) wurden in je 2,5µl eines Gemisches aus 25mM Blue Dextran-EDTA (pH 8,0; Applied Biosystems, Weiterstadt) und Formamid (Verhältnis 1:5) aufgenommen und für 2min bei 90°C denaturiert. Von diesen Ansätzen wurden jeweils 1,5µl auf eine Laufspur des Gels aufgetragen und über 7h bei 2700V mit 1xTBE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Daten wurden von einem angeschlossenen Rechner automatisch aufgenommen.

Die resultierenden Sequenzdaten wurden in der Folge mittels des Computerprogramms SeqMan® (DNA-Star Inc., Madison, WI, USA) aneinandergesetzt und konnten so auf Sequenzvariationen bewertet werden.

Detektierte exonische Variationen wurden nicht nur über die weitere Sequenzierung von Kontroll-DNA überprüft, sondern auch über die Datenbank UniGene (9, 93, 94) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html>). Dort werden zusammengehörige ESTs in sogenannten UniGene-Clustern zusammengefügt.

2.3 Lösungen und Puffer

(soweit nicht im Text aufgeführt)

| | |
|---------------------------|---|
| 10xPCR-Puffer® | Enthält 15mM MgCl ₂ pro 10µl |
| 10xTBE | 107,32g 0,89M TRIS, 55,03g 0,89M Borsäure, 7,44g 2mM EDTA; pH 8,3 |
| Bromphenolblau-Ladepuffer | 10ml 10xTBE, 40ml 20% Ficoll, 10ml 0,1% Bromphenolblau, 40ml H ₂ O |
| Silbernitrat (99,9%) | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Natriumcarbonat | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Salpetersäure (69-72%) | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Essigsäure (99,7%) | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Ethanol (96%) | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| TEMED 5 ml | Bio-Rad, München |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Formaldehyd (37%) | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Formamid (100ml) | AMRESCO, Solon, USA |
| Acrylamid/Bisacrylamid (49:1) 40% | Sigma, Deisenhofen |
| Ficoll | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, |
| Extran | Merck KGaA, Darmstadt |
| TRIS | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Borsäure | Merck KGaA, Darmstadt |
| EDTA | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Harnsäure | Merck KGaA, Darmstadt |

2.4 Geräte und Materialien

(soweit nicht im Text aufgeführt)

| | |
|---|----------------------------------|
| Eppendorf Reference® Pipetten (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl) | Eppendorf GmbH, Hamburg |
| Eppendorf Standartips Pipettenspitzen | Eppendorf GmbH, Hamburg |
| Standard Reaktions- gefäß 3810X (1,5 ml) | Eppendorf GmbH, Hamburg |
| Centrifuge 5810 R | Eppendorf GmbH, Hamburg |
| Centrifuge 5417 C | Eppendorf GmbH, Hamburg |
| MS 1IKA-Minishaker | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Analysenwaage Typ 1801 | Sartorius AG, Göttingen |

DU®640 Spectro-
photometer

Beckman Instruments GmbH, München

Multimage® Light
Cabinet

Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA

Vakuumentrifuge
SpeedVac®System

Life Sciences International, Frankfurt

AES 1010

3 ERGEBNISSE

Die im folgenden verwendete Nomenklatur zur Beschreibung von Art und Position detektierter Mutationen folgt der Empfehlung von Dunnen et Antonarakis (23).

Hierbei wird einer Positionsangabe ein „g.“ vorangestellt, wenn eine genomische Referenzsequenz benutzt wird und ein „c.“, wenn eine cDNA als Referenzsequenz Verwendung findet.

Im Gen selbst bekommt das A aus dem ATG des initiatorischen Methioninkodons die Nummer 1. Von hier aus wird in 3'-Richtung weiter fortlaufend durchnummeriert. Auf diese Nummerierung beziehen sich somit exonische Positionsangaben. Die 73. Base einer cDNA hätte somit die Position c.73.

Zur Beschreibung intronischer Positionen wird als Referenzpunkt die nächstgelegene Intron-Exon-Grenze verwendet, von wo aus die Entfernung in Basen abgezählt wird. Je nachdem, ob von der 5'- oder 3'-Seite ausgehend gezählt wird, bekommt die Position ein „+“ oder „-“ zugeordnet. Weiter wird der Bezeichnung zur Verdeutlichung einer intronischen Position ein „IVS“ mitsamt der Intronnummer vorangestellt. So hätte die 18. Base des zweiten Introns die Bezeichnung IVS2+18. Läge sie jedoch im vierten Intron 15 Basen vor der Intron-Exon-Grenze und würde von dort aus in 5'-Richtung gezählt, hätte sie die Position IVS5-15.

Eine Basensubstitution von A zu G wird mit „A>G“ beschrieben. Diese Abfolge wird nun einfach der Positionsangabe angehängt. So würde eine Basensubstitution von C nach T an Position 634 der cDNA mit c.634C>T bezeichnet. Eine intronische Veränderung von G nach T im dritten Intron 62 Basen nach der Exon-Intron-Grenze in 3'-Richtung würde als IVS3+62G>T ausgedrückt.

Resultierende Veränderungen auf Aminosäuren(AS)-Ebene werden wie folgt beschrieben. AS werden mit dem „Ein-Buchstaben-Code“ abgekürzt. Dem Kodon für das initiale Methionin wird die Position 1 zugeordnet. Ein Austausch der 67. AS von Alanin (A) zu Tryptophan (W) würde „A67W“ abgekürzt.

Hinsichtlich der Darstellung der Mutationen selber werden lediglich die exonischen sowie die exon-nahen graphisch gezeigt, also diejenigen, die allein aufgrund ihrer Lage mit höherer Wahrscheinlichkeit Konsequenzen für die Translation haben können.

3.1 Ergebnisse zu *SPHK-1*

3.1.1 Genomische Organisation von *SPHK-1*

Die genomische Organisation wurde wie beschrieben (siehe 2.2.2, Genomische Charakterisierung) ermittelt.

Das *SPHK-1*-Gen besteht aus fünf Exonen, deren cDNA 1693b groß ist und sich auf dem BAC-Klon AC068145 über ungefähr 2500b verteilt. Dabei beginnt der ORF an Position 270 und endet an Position 1424.

Die Ergebnisse sind detailliert in Tab.4 und schematisch in Abb.13 zusammengefaßt.

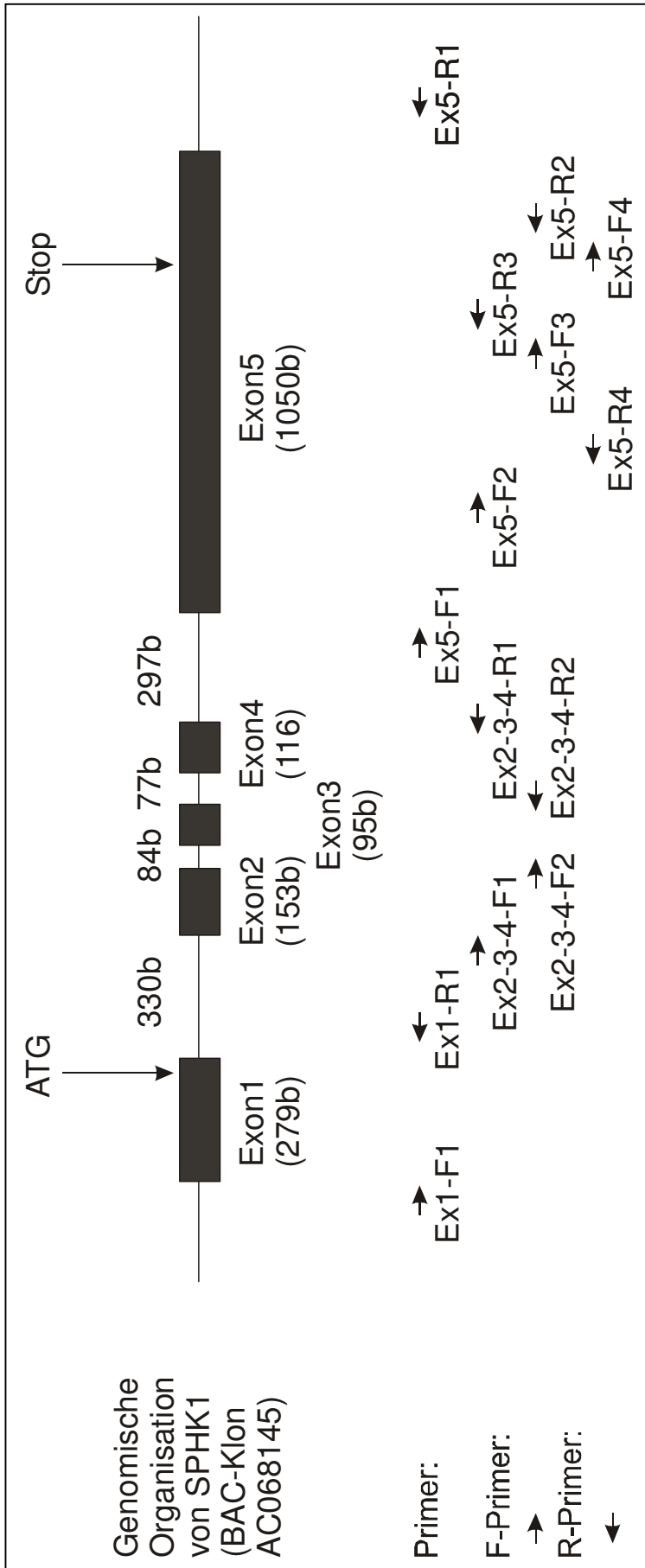


Abb.14: Genomische Organisation von *SPHK1*

| Exon-nummer | Exon-position auf der cDNA ^a | Exonposition auf dem BAC ^b -Klon | Exon-größe (b) | Akzeptor-Sequenz ^{c, d} | Donor-Sequenz ^{c, d} | Intron-nummer | Intron-größe (b) |
|-------------|---|---|----------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------|------------------|
| 1 | 1-279 | 47792-48076 | 279 | cccgcgcgtg GTCCCGGGAT | ATGGATCCAG gtttgtgggg | 1 | 330 |
| 2 | 280-432 | 48406-48559 | 153 | gttttctcag CGGGCGGCC | ATGCTCACTG gtgagtacct | 2 | 84 |
| 3 | 433-527 | 48643-48738 | 95 | ctccctgcag AGCGGCGGAA | GATGCACGAG gtgaggaccg | 3 | 77 |
| 4 | 528-643 | 48815-48931 | 116 | gcttcaacag GTGGTGAACG | ATTATGCTGG gtgagagccc | 4 | 297 |
| 5 | 644-1693 | 49228-50278 | 1050 | cccctgcag CTATGAGCAG | GACATTCCCA gcctgctcgt | - | - |

Tab.4: Genomische Organisation von *SPHK1*

^a Zugangsnummer AF266756

^b Zugangsnummer AC068145

^c Im Falle widersprüchlicher Daten verschiedener GenBank-Eintragungen wurden unsere eigenen Sequenzierungsergebnisse als Referenz benutzt.

^d Intronische Sequenzen sind in Kleinbuchstaben und exonische Sequenzen in Großbuchstaben dargestellt.

^b Basenzahl als Einheit

3.1.2 Primerdesign zu *SPHK-1*

Die Ergebnisse der genomischen Organisation wurden zur Herstellung der Primer verwendet. Die Sequenzen der benutzten Primer sind in Tab.5 dargestellt.

| Exonnummer und Ausrichtung des Primers | Primersequenz (5'-3') | Produktgröße (bp) | Annealing-Temperatur (°C) |
|--|-------------------------|-------------------|---------------------------|
| SPHK-Ex1-F | TCAGGGATTGTAGGCTTAGTCAC | 427 | 52 |
| SPHK-Ex1-R | GGAACAGGAATCCCCCTACAG | | |
| SPHK-Ex2-3-4-F | CACTAGTGCCCCATTGTTACCC | 654 | 55 |
| SPHK-Ex2-3-4-R | GCGGTAGAGGAGCACTGACG | | |
| SPHK-Ex2-3-4-F2 (I) | GTCCTGATAGCTGCCGGTCTC | - | - |
| SPHK-Ex2-3-4-R2 (I) | AGTGCGGTCCTCACCTCGTG | - | - |
| SPHK-Ex5-F | GAGGAGGAAGCGGGGATAAC | 1207 | 55 |
| SPHK-Ex5-R | GGCACCATTGGCCATCATTAC | | |
| SPHK-Ex5-F2 (I) | ACCTCCCTGTAGGAAGAG | - | - |
| SPHK-Ex5-R2 (I) | CTTCTCCAGAGGAGTCTC | - | - |
| SPHK-Ex5-F3 (I) | CCCTACTTGGTATATGTG | - | - |
| SPHK-Ex5-R3 (I) | AAACACACCTTTCCCATC | - | - |
| SPHK-Ex5-F4 (I) | TGCAGGGCCTGTCCACAG | - | - |
| SPHK-Ex5-R4 (I) | TACCGGGCCCTGCTGGAC | - | - |

Tab.5: Primer für *SPHK1*, nach Exonen aufgeschlüsselt.

(I) Interner Primer für die Sequenzier-PCR

3.1.3 Mutationsanalyse von *SPHK-1*

Die Mutationsanalyse von *SPHK-1* ergab neben einer Reihe von offensichtlichen Sequenzierfehlern in der Referenz-cDNA AF266756 mehrere Basenveränderungen in den untersuchten Personen.

3.1.3.1 Detektierte Sequenzierfehler in AF266756

Infolge der Sequenzierung der Referenzpersonen und etwaiger Kontrollen wurden eine Reihe von Basenabweichungen und Insertionen gegenüber der cDNA-Referenzsequenz AF266756 offensichtlich, die alle untersuchten

Individuen betreffen und somit als Sequenzierfehler von AF266756 gewertet werden müssen. Sie sind im einzelnen in Tab.6 aufgeführt und befinden sich alle außerhalb der kodierenden Sequenz im Bereich der untranslatierten Regionen (UTR). Sie finden an dieser Stelle Erwähnung, weil die zusätzlichen Basen natürlich die Positionsangaben der im folgenden aufgeführten Basenabweichungen verändern. Daher werden deren Positionsangabe einerseits weiterhin auf die (fehlerhafte) cDNA AF266756 bezogen und andererseits die korrigierte Position in Klammern gesetzt.

| Position auf AF266756 | Gefundene Sequenzierfehler | Position auf der KS | Zahl der Kontrollen |
|-----------------------|--|---------------------|---------------------|
| c.23/c.24 | Zwischen Position c.23 und c.24 zeigen alle analysierten Individuen ein zusätzliches „C“ | Außerhalb (5'-UTR) | 24 |
| c.135/c.136 | Zwischen Position c.135 und c.136 zeigen alle analysierten Individuen ein zusätzliches „G“ | Außerhalb (5'-UTR) | 24 |
| c.139/c.140 | Zwischen Position c.139 und c.140 zeigen alle analysierten Individuen ein zusätzliches „C“ | Außerhalb (5'-UTR) | 24 |
| c.150/c.151 | Zwischen Position c.150 und c.151 zeigen alle analysierten Individuen ein zusätzliches „C“ | Außerhalb (5'-UTR) | 24 |
| c.177 | Alle analysierten Individuen zeigen ein „C“ an Position c.177 anstelle eines „G“ | Außerhalb (5'-UTR) | 24 |
| c.189 | Alle analysierten Individuen zeigen ein „G“ an Position c.189 anstelle eines „A“ | Außerhalb (5'-UTR) | 24 |
| c.212/c.213 | Zwischen Position c.212 und c.213 zeigen alle analysierten Individuen ein zusätzliches „G“ | Außerhalb (5'-UTR) | 24 |
| c.1438 | Alle analysierten Individuen zeigen ein „C“ an Position c.1438 anstelle eines „T“ | Außerhalb (3'-UTR) | 18 |
| c.1646 | Alle analysierten Individuen zeigen ein „C“ an Position c.1646 anstelle eines „T“ | Außerhalb (3'-UTR) | 18 |

Tab.6: Gefundene Sequenzierfehler in AF266756 (cDNA of *SPHK1*).

UTR Untranslatierte Region

KS Kodierende Sequenz

3.1.3.2 Mutationsanalyse und Kontrollen

Insgesamt fanden sich neben den beschriebenen Sequenzierfehlern drei Basenabweichungen gegenüber der Referenz-cDNA (Tab.7):

Erstens fand sich im Exon1 c.103A>G (siehe Abb.15), also c.104A>G, bezogen auf die korrigierte Position (siehe 3.1.3.1, Detektierte Sequenzierfehler in AF266756) (Kor: c.104A>G). Wegen der Lage außerhalb der kodierenden Sequenz in der 5'-UTR hat dies keinen Aminosäure(AS)-Austausch zur Folge.

Es ergab sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

A homozygot: 4003-31 (krank);

A/G: 4003-30 (gesund), 4004-14 (krank);

G homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund).

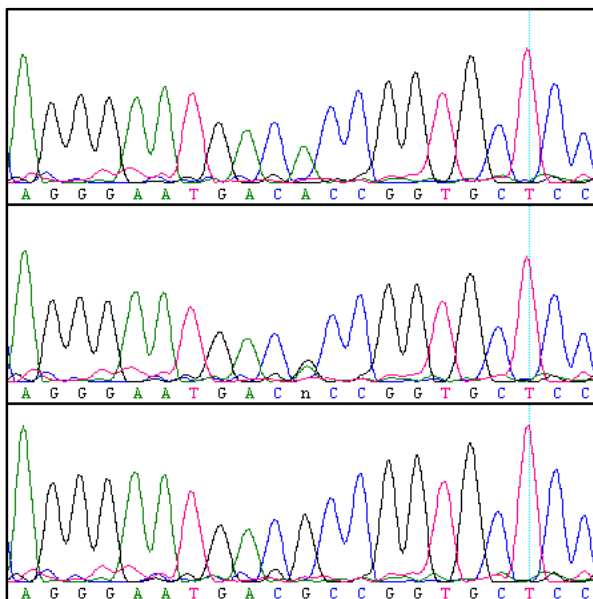


Abb.15: Basenabweichung c.103A>G (Kor: c.104A>G)

Die zweite Basenabweichung war c.115A>G (Kor: c.116A>G) (siehe Abb.16). Auch hier führt die Position außerhalb der kodierenden Sequenz in der 5'-UTR zu keinem AS-Austausch.

Es ergab sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

A homozygot: HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund),
4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

A/G: HNA8III10 (krank);

G homozygot: Niemand.

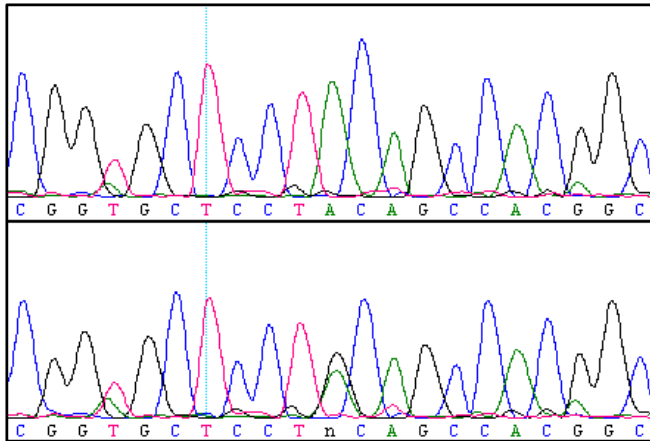


Abb.16: Basenabweichung c.115A>G (Kor: c.116A>G)

Als dritte Basenveränderung fand sich c.1232T>C (Kor: c.1237T>C) (siehe Abb.17) im Exon 5. Diese betrifft die 963. Base der kodierenden Sequenz und führt somit als „Dritte-Base-Änderung“ nicht zur Veränderung der vorliegenden AS Tyrosin.

Folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen ergab sich:

T homozygot: HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-31 (krank);

T/C: HNA8III10 (krank), 4003-30 (gesund), 4004-14 (krank);

C homozygot: Niemand.

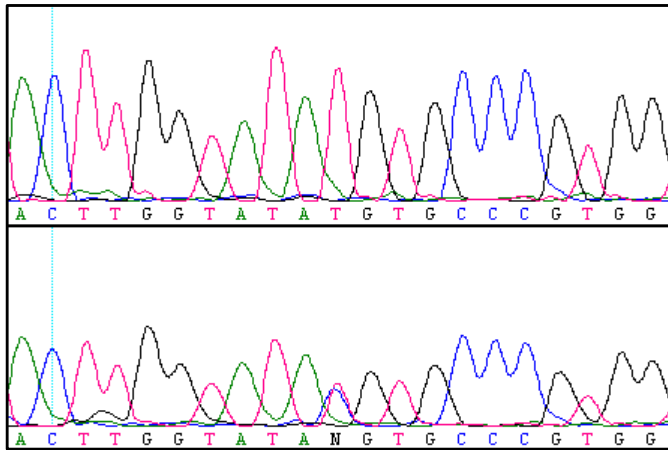


Abb.17: Basenabweichung c.1232T>C (Kor: c.1237T>C)

Alle Basenveränderungen wurden an 18 Negativkontrollen überprüft. Die ermittelten Allelfrequenzen sind in Tab.7 dargestellt.

| Gen-Symbol | Zugangsnummer der cDNA | Sequenzvariation und Position ^a (Exon) | Sequenzvariation und Position ^b | AS-Wechsel ^a | Zahl der Kontrollen | Allelfrequenz der Kontrollgruppe ^c |
|--------------|------------------------|---|--|---------------------------------|---------------------|---|
| <i>SPHK1</i> | AF266756 | c.103A>G (Kor: c.104A>G) (Exon 1) | Außerhalb der KS (5'-UTR) | - | 18 | A/A: 22,2% A/G: 44,4% G/G: 33,3% |
| | | c.115A>G (Kor: c.116A>G) (Exon 1) | Außerhalb der KS (5'-UTR) | - | 18 | A/A: 72,2% A/G: 22,2% G/G: 5,6% |
| | | c.1232T>C (Kor: c.1237T>C) (Exon 5) | 963 (Kor: 963) | - (Y321Y) (Kor: Y321Y) | 18 | T/T: 66,7% T/C: 27,8% C/C: 5,6% |

Tab.7: Ergebnisse der Mutationsanalyse und durchgeführter Kontrollen von *SPHK-1*

^a Sequenzvariation und -position auf DNA-Ebene wie auch der resultierende Aminosäure(AS)-Wechsel werden wie von Dunnen 2000 vorgeschlagen wiedergegeben (23). Die Position ist im Falle exonischer Variationen auf die zugehörige cDNA und im Fall intronischer Variationen auf den zugehörigen BAC-Klon bezogen

^b Die Position der gefundenen Sequenzvariation wird auf die kodierende Sequenz bezogen

KS Kodierende Sequenz

Kor Korrigierte AF266756-Sequenz (siehe Text und Tab.6)

3.1.4 Kontrolle der Ergebnisse von *SPHK-1* mittels UniGene

Zusätzlich zu den durch direkte Sequenzierung durchgeführten Negativkontrollen wurden die im zugehörigen UniGene-Cluster Hs.68061 enthaltenen EST-Sequenzen als Negativkontrollen genutzt. Ihre Allelfrequenzen zeigt Tab.9.

| Gen | Zugangsnummer der cDNA | Sequenzvariation und Position ^a | AS-Wechsel ^a | UniGene Cluster | Zahl der Kontrollen (ESTs) | Allel-Frequenz im UniGene |
|--------------|------------------------|--|-------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>SPHK1</i> | AF266756 | c.1232T>C | Y>Y | Hs.68061 | 25 | T: 80%, C: 16%, A: 4% |

Tab.8: Vergleich der gefundenen exonischen Sequenzvariationen von *SPHK-1* mit UniGene-Cluster Hs.68061. Die Zahl der im Cluster an der betreffenden Position enthaltenen ESTs, also die Zahl der Kontrollen, wird angegeben.

^a Sequenzvariation und -position auf DNA-Ebene wie auch der resultierende Aminosäure(AS)-Wechsel werden wie von Dunnen 2000 vorgeschlagen wiedergegeben (23). Die Position ist im Falle exonischer Variationen auf die zugehörige cDNA und im Fall intronischer Variationen auf

3.2 Ergebnisse zu *TIMP2*

3.2.1 Genomische Organisation von *TIMP2*

Die genomische Organisation wurde wie beschrieben (siehe 2.2.2, Genomische Charakterisierung) ermittelt.

Das *TIMP2*-Gen besteht aus vier bekannten Exonen und mindestens einem unbekanntem. Die Länge der cDNA beträgt 1075b. Dabei beginnt der putative ORF an Position 303 und ist 663b lang. Die bekannten Exone kommen beim Alignment auf dem BAC-Klon AC025609 zu liegen. Eine Sequenz von 431b am Beginn der cDNA allerdings findet sich auf dem BAC-Klon AC025609 nicht wieder. Dies ist durch das Fehlen von Sequenzanteilen und das (noch) ungeordnete Vorliegen des Klons in sechs Teilen als „working draft sequence“ erklärt. In wie viele Exons sich dieses cDNA-Stück noch aufspaltet, ist somit unbekannt. Weiterhin ist hierdurch der Beginn des ORF in einer Länge von 128b bisher nicht analysierbar. Im Folgenden wird dieser erste unbekannte Teil mit Exon 1 bezeichnet.

Die Ergebnisse sind detailliert in Tab.9 und schematisch in Abb.18 zusammengefaßt.

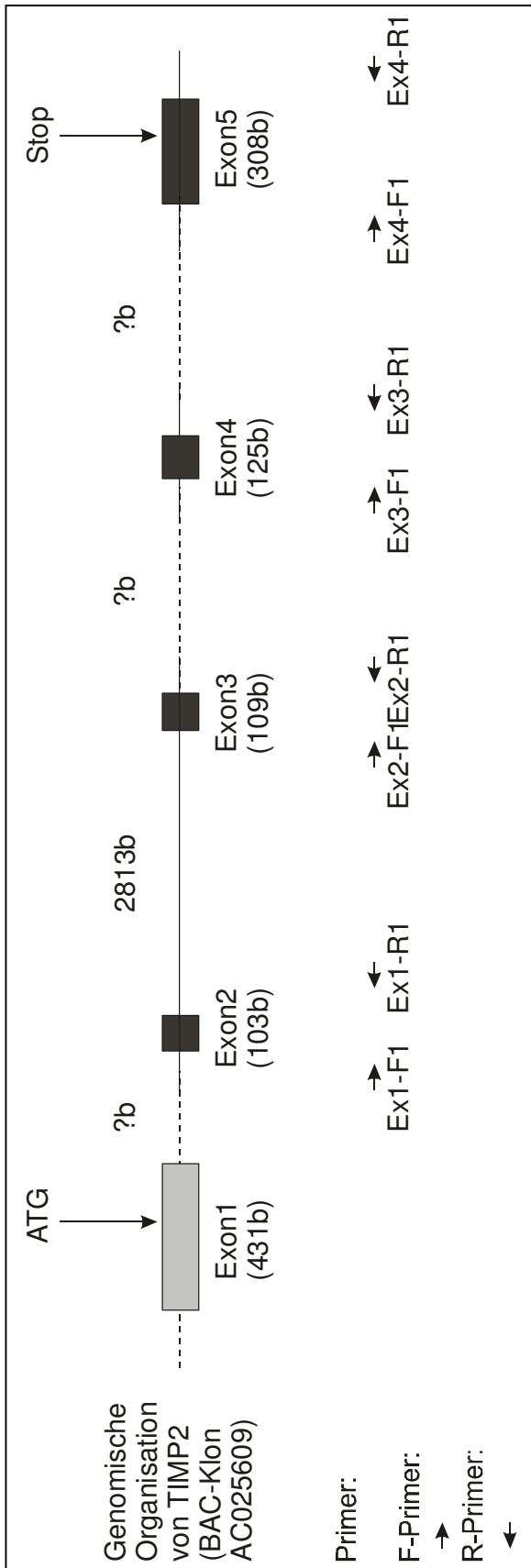


Abb.18: Genomische Organisation von *TIMP2*

| Exon-nummer | Exon-position auf der cDNA ^a | Exon-position auf dem BAC -Klon ^b | Exon-größe (b) | Akzeptor-Sequenz ^d | Donor- Sequenz ^d | Intron-größe (b) | Intron-nummer |
|-------------|---|--|----------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------|---------------|
| 1 (A) | 1-430 | NB | 431 | NB | NB | NB | 1 |
| 2 | 431-533 | 83836-83939 | 103 | tggttttgc AGTGATCAGG | GCAGATAAAG gtaatagtg | 2813 | 2 |
| 3 | 534-642 | 86752-86861 | 109 | gtctttccag ATGTTCAAAG | CTCATTGCAG gtgtgtatga | NB | 3 |
| 4 | 643-767 | 109340-109465 | 125 | ctctccgcag GAAAGGCCGA | CGAGTGCAAG gtaagcaggt | NB | 4 |
| 5 | 768-1075 | 70991-71299 | 308 | ccctcccag ATCACGCGCT | CACTCATCCC atgggtccaa | - | - |

Tab.9: Genomische Organisation von *TIMP2*

^a Zugangsnummer NM_003255

^b Zugangsnummer AC025609

^d Intronische Sequenzen sind in Kleinbuchstaben und exonische Sequenzen in Großbuchstaben dargestellt.

b Basenzahl als Einheit

NB Nicht bestimmbar wegen Sequenzlücken von AC068145

A Angenommenes Exon (wegen Sequenzlücken von AC025609 nicht festzulegen)

3.2.2 Primerdesign zu *TIMP2*

Die Ergebnisse der genomischen Organisation wurden zur Herstellung der Primer verwendet. Die Sequenzen der benutzten Primer sind in Tab.10 dargestellt.

| Exonnummer und Ausrichtung Primers | und des (5'-3') | Primersequenz | Produktgröße (b) | Annealing-Temperatur (°C) |
|------------------------------------|-----------------|-------------------------|------------------|---------------------------|
| TIMP2-Ex2-F | | ctggacgtcttatccctctcctt | 250 | 54 |
| TIMP2-Ex2-R | | ctctctgccaacccaacac | | |
| TIMP2-Ex3-F | | tgttctggatgggaacggaa | 300 | 50 |
| TIMP2-Ex3-R | | ttcctcagctactccgctc | | |
| TIMP2-Ex4-F | | ttgttgcaacgaaatcccag | 296 | 56 |
| TIMP2-Ex4-R | | aaaatccctgccgtccatct | | |
| TIMP2-Ex5-F | | gtaggcacattgccgggtt | 281 | 56 |
| TIMP2-Ex5-R | | tcgagaaactcctgcttggg | | |

Tab.10: Primer für *TIMP2*, nach Exonen aufgeschlüsselt

3.2.3 Mutationsanalyse und Kontrollen von *TIMP2*

Insgesamt fanden sich zwei Basenabweichungen gegenüber der Referenz-cDNA NM_003255 (Tab.3.2.3.1):

Erstens fand sich im Exon3 c.605G>A (siehe Abb.19). Diese Position ist bereits innerhalb der kodierenden Sequenz an Stelle 303 gelegen und bewirkt somit als Veränderung der dritten Base eines Kodons keinen Austausch von Serin.

Es ergab sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

G homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund);

G/A: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

A homozygot: Niemand.

Zweitens fand sich die Veränderung c.768-151C>T im Intron 4.

Es ergab sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

C homozygot: 4003-30 (gesund);

C/T: HNA8III10 (krank), HNA2III18 (gesund);

T homozygot: HNA2IV19 (krank), 4003-31 (krank), 4004-14 (krank).

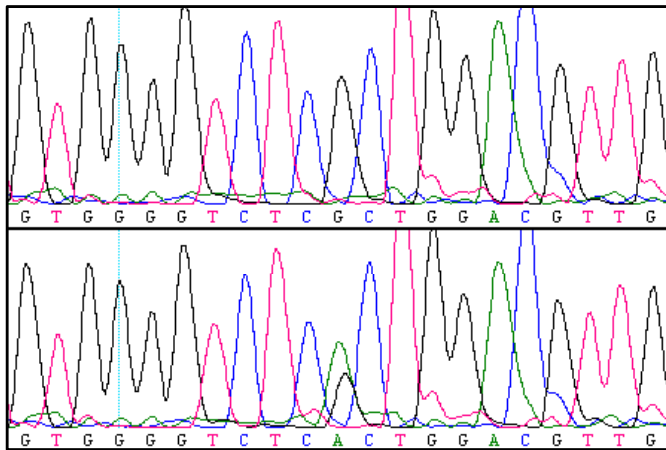


Abb.19: Basenabweichung c.605G>A

Die exonische Basenveränderung c.605G>A wurde an 18 Negativkontrollen überprüft. Die ermittelten Allelfrequenzen sind in Tab. 11 dargestellt.

| Gen-symbol | Zugangsnummer der cDNA | Sequenzvariation und Position ^a | Sequenzvariation und Position ^b | AS-Wechsel ^a | Zahl der Kontrollen | Allel Frequenz |
|--------------|------------------------|--|--|-------------------------|---------------------|---|
| <i>TIMP2</i> | NM_003255 | c.605G>A (Exon 3) | 303 | - (S101S) | 18 | G/G: 83,3%, G/A: 11,1%, A/A: 5,6% |
| | | c.768-151C>T (g.IVS4-151C>T) | Außerhalb von Exon und KS | - | 18 | ND |

Tab.11: Ergebnisse der Mutationsanalyse von *TIMP2*

^a Sequenzvariation und -position auf DNA-Ebene wie auch der resultierende Aminosäure(AS)-Wechsel werden wie von Dunnen 2000 vorgeschlagen wiedergegeben (23). Die Position ist im Falle exonischer Variationen auf die zugehörige cDNA und im Fall intronischer Variationen auf den zugehörigen BAC-Klon bezogen.

^b Die Position der gefundenen Sequenzvariation wird auf die kodierende Sequenz bezogen

KS Kodierende Sequenz (coding sequence)

ND Nicht durchgeführt wegen homozygoter Sequenzvariationen

3.2.4 Kontrolle der Ergebnisse von *TIMP2* mittels UniGene

Zusätzlich zu den durchgeführten Negativkontrollen durch direkte Sequenzierung wurden die im zugehörigen UniGene-Cluster Hs.325495 enthaltenen EST-Sequenzen als Negativkontrollen genutzt. Ihre Allelfrequenzen zeigt Tab. 12.

| Gen | Zugangsnummer der cDNA | Sequenzvariation und Position ^a | AS-Wechsel ^a | UniGene Cluster | Zahl der Kontrollen (ESTs) | Allelfrequenz im UniGene |
|--------------|------------------------|--|-------------------------|-----------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>TIMP2</i> | NM_003255 | c.605G>A | S>S | Hs.325495 | 40 | G: 77,5%, A: 22,5% |

Tab.12: Vergleich der gefundenen exonischen Sequenzvariationen von *TIMP2* mit UniGene-Cluster Hs.325495. Die Zahl der im Cluster an der betreffenden Position enthaltenen ESTs, also die Zahl der Kontrollen, wird angegeben.

^a Sequenzvariation und -position auf DNA-Ebene wie auch der resultierende Aminosäure(AS)-Wechsel werden wie von Dunnen 2000 vorgeschlagen wiedergegeben (23). Die Position ist im Falle exonischer Variationen auf die zugehörige cDNA und im Fall intronischer Variationen auf

3.3 Ergebnisse zu *LAK-4P*

3.3.1 Genomische Organisation von *LAK-4P*

Die genomische Organisation wurde wie beschrieben (siehe 2.2.2, Genomische Charakterisierung) ermittelt.

Das *LAK-4P*-Gen besteht aus zwölf Exonen. Die Länge der cDNA AB002405 beträgt 1589b. Der putative ORF beginnt an Position 53 und ist 1334b lang. Die Exone kommen beim Alignment auf dem BAC-Klon AC015802 zu liegen und erstrecken sich über eine ungefähre Länge von 11500b.

Die Ergebnisse sind detailliert in Tab.13 und schematisch in Abb.20 zusammengefaßt.

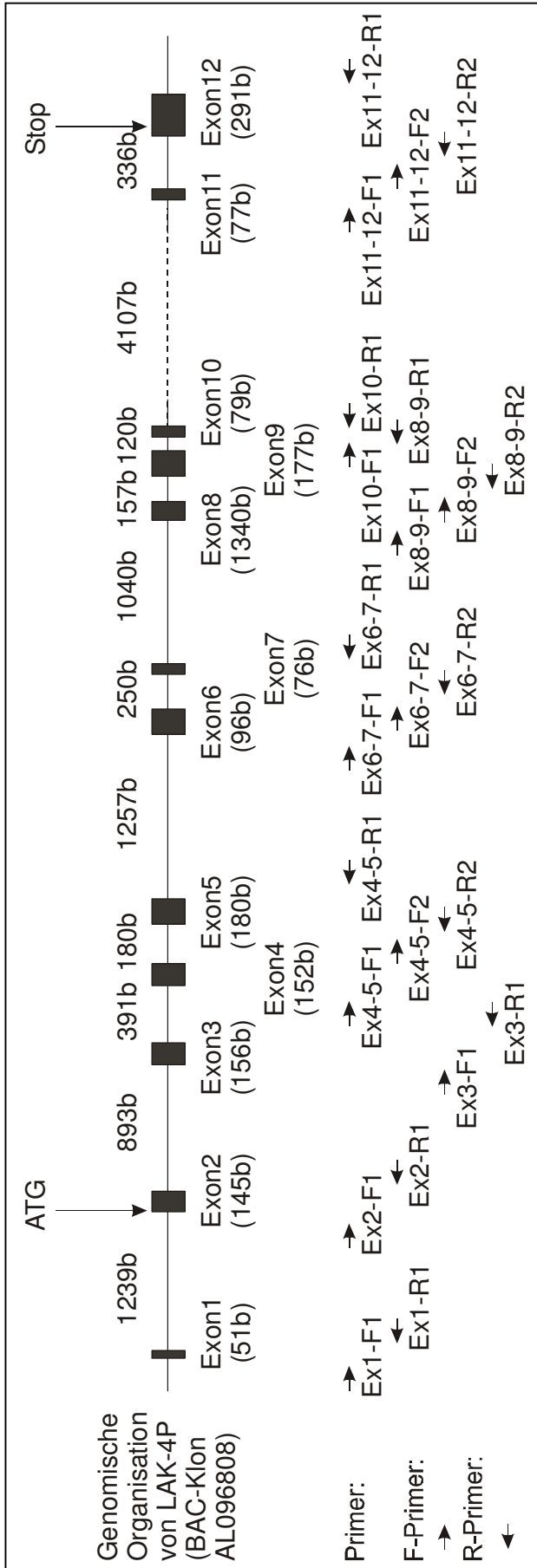


Abb.20: Genomische Organisation von *LAK-4P*

| Exon-nummer | Exon-position auf der cDNA ^a | Exonposition auf dem BAC-Klon ^b | Exon-größe (bp) | Akzeptor-Sequenz ^{c, d} | Donor-Sequenz ^{c, d} | Intron-nummer | Intron-größe (bp) |
|-------------|---|--|-----------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|
| 1 | 1-51 | 17892-17943 | 51 | tggcctacct CTCCACTGTG | TGGTGTACAG gtaacgcctc | 1 | 1239 |
| 2 | 52-196 | 19182-19327 | 145 | ttctccgcag CATGGCTCAC | CCGGCTGAAG gtgagtggcc | 2 | 893 |
| 3 | 197-352 | 20220-20376 | 156 | ccgcctgcag GAGCTGCTGG | CATGATCCAG gtgcggggat | 3 | 391 |
| 4 | 353-504 | 20767-20919 | 152 | accctgcag AGTCCAGAGG | CCATCTGCAG gtgtgtggcc | 4 | 180 |
| 5 | 505-684 | 21099-21279 | 180 | ccctccgcag GAACCTCATC | TGGTGTGGAG gtgagggggt | 5 | 1257 |
| 6 | 685-780 | 22536-22632 | 96 | tcgaggcag GATTATCTCC | CTCTGACCTG gtgagggtcc | 6 | 250 |
| 7 | 781-856 | 22882-22958 | 76 | ccctcccag GCTGGGGGT G | TGTCAAGAAG gtgaggctgc | 7 | 1040 |
| 8 | 857-990 | 23998-24132 | 134 | ttccccacag ACCAGCCTTC | CCGTCTGGCA gtgagtgggg | 8 | 157 |
| 9 | 991-1167 | 24289-24466 | 177 | tcttcccag GGTGAAGCCC | CCCTGCTGCT gtgagtccc | 9 | 120 |
| 10 | 1168-1246 | 24586-24665 | 79 | tctccgcag GGCCGTGATC | GATCAGCAAT gtgagtgcc | 10 | 4107 |
| 11 | 1247-1323 | 28772-28849 | 77 | gccttctag GAGGGTGAG G | AGAGGAGCA Ggtgagggtcc | 11 | 336 |
| 12 | 1324-1589 | 29185-29476 | 291 | tttctggcag GGTTGGGACA | TTTTGCAAAT gggcttgcc | - | - |

Tab.13: Genomische Organisation von *LAK-4P*

^a Zugangsnummer AB002405

^b Zugangsnummer AC015802

^d Intronische Sequenzen sind in Kleinbuchstaben und exonische Sequenzen in Großbuchstaben dargestellt.

^b Basenzahl als Einheit

3.3.2 Primerdesign zu *LAK-4P*

Die Ergebnisse der genomischen Organisation wurden zur Herstellung der Primer verwendet. Die Sequenzen der benutzten Primer sind in Tab.14 dargestellt.

| Exonnummer und Ausrichtung Primers | und des | Primersequenz (5'-3') | Produktgröße (bp) | Annealing-Temperatur (°C) |
|---|----------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| LAK-4P-Ex1-F | | ctacagtaacgccacgctgaac | 274 | 55 |
| LAK-4P-Ex1-R | | gcagacaggtagatggacagaag | | |
| LAK-4P-Ex2-F | | gtctgccttctccgcttgg | 311 | 55 |
| LAK-4P-Ex2-R | | tctagaccatggttctggtcac | | |
| LAK-4P-Ex3-F | | ttgtgctgtgtctgcacgtc | 336 | 55 |
| LAK-4P-Ex3-R | | gctggctgggtggaggag | | |
| LAK-4P-Ex4-5-F | | gagggtctacctgccagttc | 738 | 55 |
| LAK-4P-Ex4-5-R | | ttcctctgaagggtggagacac | | |
| LAK-4P-Ex4-5-F2 (I) | | gaggccggtgtgaccaag | - | - |
| LAK-4P-Ex4-5-R2 (I) | | ggatacaccggagctaaacaa | - | - |
| LAK-4P-Ex4-5-F (SSCP) | | gtgcatcttctgtcccctgt | 197 | 60 |
| LAK-4P-Ex4-5-R (SSCP) | | aggacgaagtccatcaccag | | |
| LAK-4P-Ex6-7-F | | gtctcttcttggcattatctgtg | 794 | 56 |
| LAK-4P-Ex6-7-R | | gtacctgctaatagaccttgaac | | |
| LAK-4P-Ex6-7-F2 (I) | | agttttggccactgtcacat | - | - |
| LAK-4P-Ex8-9-F | | gtcgcccttcctcttga | 704 | 52 |
| LAK-4P-Ex8-9-R | | ccacctggatgttgaggtagat | | |
| LAK-4P-Ex8-9-F2 (I) | | tggagtgatgcagaccctaacc | - | - |
| LAK-4P-Ex8-9-R2 (I) | | ctcaccggagcaacagt | - | - |
| LAK-4P-Ex10-F | | acctgatggaaaacacctcttt | 338 | 54 |
| LAK-4P-Ex10-R | | acaggagatgtacaggggagtg | | |

| | | | |
|-----------------------|------------------------|-----|----|
| LAK-4P-Ex11-12-F | aatgcagtttgaacaggatg | 881 | 52 |
| LAK-4P-Ex11-12-R | aggttcccaggaccagac | | |
| LAK-4P-Ex11-12-F2 (I) | gttgcagggatgttgatgttat | - | - |
| LAK-4P-Ex11-12-R2 (I) | ccctccaggctcagagtgt | - | - |

Tab.14: Primer für *LAK-4P*, nach Exonen aufgeschlüsselt

(I) Interner Primer für die Sequenzier-PCR
(SSCP) Primer zur SSCP-Analyse

3.3.3 Mutationsanalyse und Kontrollen von *LAK-4P*

Insgesamt fanden sich bei den durchgeführten Untersuchungen 14 Basenabweichungen gegenüber der Referenz-cDNA (Tab.15): Davon wurden vier ausschließlich bei gesunden Kontrollen detektiert. Die übrigen fanden sich bei den sechs Referenzpersonen, die standardmäßig untersucht wurden.

In der Gruppe der Referenzpersonen fanden sich folgende Veränderungen:
Erstens fand sich c.51+5T>C im Intron 1 (siehe Abb.21).

Es ergab sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

T homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund);

T/C: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

C homozygot: Niemand.

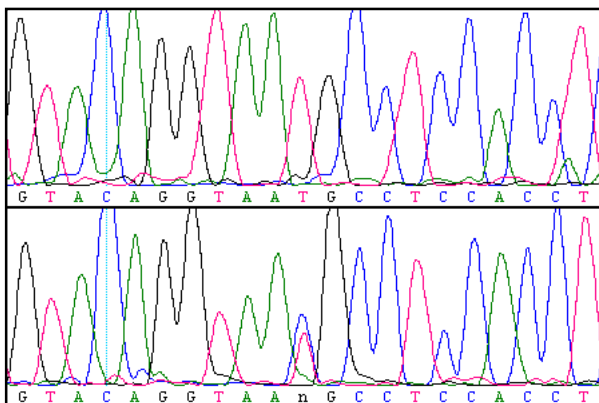


Abb.21: Basenabweichung c.51+5T>C

Zweitens wurde ausschließlich in einer der gesunden Referenzpersonen die Basenveränderung c.476G>A in Exon 4 beobachtet (siehe Abb.22). Dies betrifft die Position 415 in der kodierenden Sequenz und bewirkt somit eine Veränderung der ersten Base im 138. Kodon. Dies führt zum AS-Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin (D138N).

Folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen fand sich:

G homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), 4003-30 (gesund), 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

G/A: HNA2III18 (gesund);

A homozygot: Niemand.

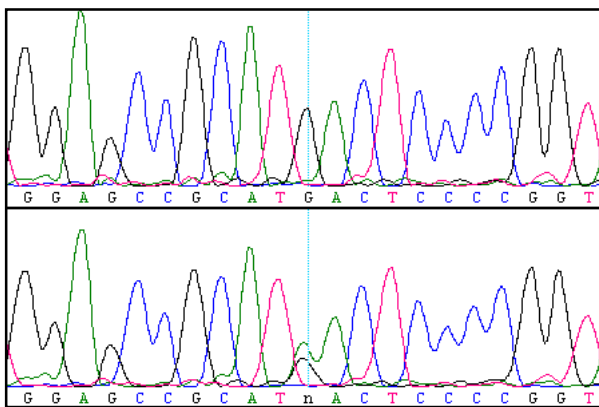


Abb.22: Basenabweichung c.476G>A

Drittens wurde die Basenveränderung c.505-4G>A im Intron 4 detektiert (siehe Abb.23).

Es ergab sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

G homozygot:, HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund), 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

G/A: HNA8III10 (krank);

A homozygot: Niemand.

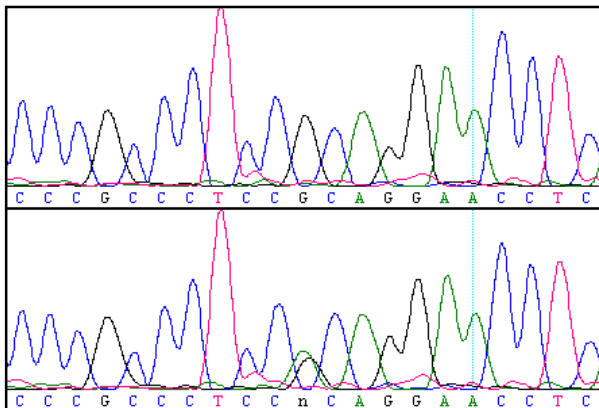


Abb.23: Basenabweichung c.505-4G>A

Viertens fand sich die Basenveränderung c.780+25G>A im Intron 6.

Es zeigte sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

G homozygot: Niemand;

G/A: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

A homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund).

Fünftens fand sich c.780-54A>T im Intron 7.

Daraus resultierte folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

A homozygot: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

A/T: Niemand;

T homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund).

Sechstens wurde, ebenfalls im Intron 7, c.856+77A>C entdeckt.

Folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen fand sich:

A homozygot: Niemand;

A/C: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

C homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund).

Siebtens wurde, auch im Intron 7, die Basenveränderung c.856+89C>G gefunden.

Es ergab sich folgende Basenkonstellation der untersuchten Personen:

C homozygot: Niemand;

C/G: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

G homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund).

Achtens konnte, wiederum im Intron 7, die Änderung c.856+111A>G detektiert werden.

Die untersuchten Personen zeigten folgende Basenkonstellation:

A homozygot: Niemand;

A/G: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

G homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund).

Auch im Intron 7 wurde neuntens c.856+189T>C gefunden.

Bei den untersuchten Personen zeigte sich folgende Basenkonstellation:

T homozygot: HNA8III10 (krank), HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund).

T/C: 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

C homozygot: Niemand.

Zehntens ergab sich c.938+11C>T im Intron 8 (siehe Abb.24).

Die untersuchten Personen zeigten folgende Basenkonstellation:

A homozygot: HNA2IV19 (krank), HNA2III18 (gesund), 4003-30 (gesund), 4003-31 (krank), 4004-14 (krank);

A/G: HNA8III10 (krank);

G homozygot: Niemand.

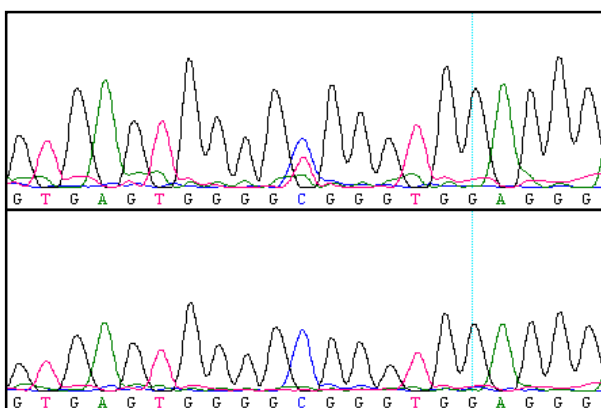


Abb.24: Basenabweichung c.938+11C>T

All diese aufgeführten Befunde wurden, wie beschrieben, an gesunden, nichtverwandten deutschen Kontrollen überprüft. Die resultierenden Allelfrequenzen sind in Tab.15 zusammengefaßt.

Bezüglich der Basenveränderung c.505-4G>A im Intron 4 wurden neben der Untersuchung 34 gesunder, nichtverwandter deutscher Kontrollen durch direkte Sequenzierung weitere Schritte unternommen:

Erstens wurde die Zahl gesunder, nichtverwandter deutscher Kontrollen mittels SSCP-Analyse um 125 Personen erweitert. Zweitens wurden wegen möglicher ethnisch-spezifischer Polymorphismen 50 spanische gesunde, nichtverwandte Kontrollpersonen durch direktes Sequenzieren untersucht. Diese Ergebnisse sind auch in Tab.15 aufgeführt.

Drittens wurden erkrankte und nichterkrankte Familienangehörige der HNA8-Familie auf die Basenveränderung c.505-4G>A überprüft. Die Befunde hierzu finden sich in der Tab.17 (Abschnitt 3.3.5, Assoziation der c.505-4G>A-Transition mit HNA und dysmorphen Zeichen in der HNA8-Familie).

Bei der Sequenzierung der gesunden Kontrollen fanden sich, wie oben erwähnt, vier weitere Basenabweichungen, die der Vollständigkeit halber aufgeführt werden sollen. Auch ihre Allelfrequenz ist in Tab.15 aufgeführt.

Im einzelnen sind dies die Veränderungen:

- c.451C>T in Exon 4. Hieraus resultiert die Veränderung einer dritten Base. Ein AS-Austausch bleibt aus, Alanin bleibt erhalten.
- c.474C>T in Exon 4. Hiervon ist die 422. Base im ORF betroffen. Also resultiert eine Veränderung der zweiten Base im 140. Kodon, was zum AS-Austausch P140L führt.
- c.780+77C>T in Intron 6.
- c.919C>T in Exon 8. Daraus ergibt sich eine Veränderung der 867. Base und somit ein Austausch der dritten Base im 289. Kodon, was nicht zum AS-Austausch führt; Threonin bleibt damit erhalten.

| Gen-symbol | Zugangsnummer der cDNA | Sequenzvariation und Position ^a | Sequenzvariation und Position ^b | AS-Wechsel ^a | Zahl der Kontrollen | Allel-Frequenz |
|------------|------------------------|--|--|-------------------------|---|---|
| LAK-4P | AB002405 | c.51+5T>C (g.IVS1+5T>C) | Außerhalb von Exon und KS | - | 19 | T/T: 68,4% T/C: 26,3% C/C: 5,3% |
| | | c.451C>T (NBK), (Exon 4) | 399 | - (A133A) | 34 | C/C: 94,1% C/T: 5,9% T/T: 0% |
| | | c.474C>T (NBK), (Exon 4) | 422 | P140L | 34 | C/C: 88,2% C/T: 11,8% T/T: 0% |
| | | c.476G>A (NBGA), (Exon 4) | 415 | D138N | 67 | G/G: 100%, G/A: 0% A/A: 0% |
| | | c.505-4G>A (g.IVS4-4G>A) | Außerhalb von Exon und KS | - | 34 (D) 125 (D) (SSCP) 50 (S) | G/G: 100%, A/G: 0% A/A: 0% SSCP(G): 100% G/G: 100% A/G: 0% A/A: 0% |
| | | c.780+25G>A (g.IVS6+25G>A) | Außerhalb von Exon und KS | - | 29 | G/G: 24,1% G/A: 44,8% A/A: 31% |
| | | c.780+77C>T (g.IVS6+77C>T) (NBK) | Außerhalb von Exon und KS | - | 29 | C/C: 86,2% C/T: 13,8% T/T: 0% |
| | | c.780-54A>T (g.IVS7-54A>T) | Außerhalb von Exon und KS | - | 29 | A/A: 13,8% A/T: 41,4% T/T: 44,8% |

| | | | | | | |
|--|--|---------------------------------|---------------------------------|--------------|----|--|
| | | c.856+77A>C (g.IVS7+77A>C) | Außerhalb von Exon und KS | - | 29 | A/A: 21,8% A/C: 39,1% C/C: 39,1% |
| | | c.856+89C>G (g.IVS7+89C>G) | Außerhalb von Exon und KS | - | 29 | C/C: 13% C/G: 47,8% G/G: 39,1% |
| | | c.856+111A>G (g.IVS7+111A>G) | Außerhalb von Exon und KS | - | 29 | A/A: 47,8% A/G: 43,5% G/G: 8,7% |
| | | c.856+189T>C (g.IVS7+189T>C) | Außerhalb von Exon und KS | - | 9 | T/T: 88,8% T/C: 11,1% C/C: 0% |
| | | c.919C>T (NBK) | 867 (Exon 8) | - (T289T) | 18 | C/C: 61,1% C/T: 33,3% T/T: 5,6% |
| | | c.938+11C>T (g.IVS8+11C>T) | Außerhalb von Exon und KS | - | 23 | C/C: 95,6% C/T: 4,3% T/T: 0% |

Tab.15: Ergebnisse der Mutationsanalyse von *LAK-4P*

- ^a Sequenzvariation und -position auf DNA-Ebene wie auch der resultierende Aminosäure(AS)-Wechsel werden wie von Dunnen 2000 vorgeschlagen wiedergegeben (23). Die Position ist im Falle exonischer Variationen auf die zugehörige cDNA und im Fall intronischer Variationen auf den zugehörigen BAC-Klon bezogen
- ^b Die Position der gefundenen Sequenzvariation wird auf die kodierende Sequenz bezogen
- ^c Ergebnisse durch SSCP-Analyse sind gesondert gekennzeichnet
- KS Kodierende Sequenz
- NBK Nur bei gesunden Kontrollen gefunden, aber nicht in HNA-Familien
- NBGA Nur bei einem gesunden Angehörigen einer HNA-Familie gefunden
- ND Nicht durchgeführt wegen homozygoter Sequenzvariationen
- D Deutsche Kontrollpersonen; alle anderen nichtgekennzeichneten Kontrollpersonen sind deutsch
- S Spanische Kontrollpersonen
- SSCP Ergebnisse durch SSCP-Analyse

3.3.4 Kontrolle der Ergebnisse von *LAK-4P* mittels UniGene

Zusätzlich zu den durchgeführten Negativkontrollen durch direkte Sequenzierung wurden die im zugehörigen UniGene-Cluster Hs.16165 enthaltenen EST-Sequenzen als Negativkontrollen genutzt. Ihre Allelfrequenzen zeigt Tab.16.

| Gen | Zugangsnummer der cDNA | Sequenzvariation und Position ^a | AS-Wechsel ^a | UniGene Cluster | Zahl der Kontrollen (ESTs) | Allel-Frequenz im UniGene |
|---------------|------------------------|--|-------------------------|-----------------|----------------------------|---|
| <i>LAK-4P</i> | AB002405 | c.451C>T (NBK) | A>A | Hs.16165 | 15 | C: 93,3% T: 6,7% |
| | AB002405 | c.474C>T (NBK) | P>L | Hs.16165 | 15 | C: 100% T: 0% |
| | AB002405 | c.476G>A (NBGA) | D>N | Hs.16165 | 17 | G: 100%, A: 0% |
| | AB002405 | c.919C>T (NBK) | T>T | Hs.16165 | 27 | C: 92,6% T: 0% G: 3,7% A: 3,7% |

Tab.16: Vergleich der gefundenen exonischen Sequenzvariationen von *LAK4P* mit UniGene-Cluster Hs.16165. Die Zahl der im Cluster an der betreffenden Position enthaltenen ESTs, also die Zahl der Kontrollen, wird angegeben.

^a Sequenzvariation und -position auf DNA-Ebene wie auch der resultierende Aminosäure(AS)-Wechsel werden wie von Dunnen 2000 vorgeschlagen wiedergegeben (23). Die Position ist im Falle exonischer Variationen auf die zugehörige cDNA und im Fall intronischer Variationen auf

NBK Nur bei gesunden Kontrollen gefunden, aber nicht in HNA-Familien

NBGA Nur bei einem gesunden Angehörigen einer HNA-Familie gefunden

3.3.5 Ergebnisse der SSCP-Analyse zur Basenveränderung c.505-4G>A

Bezüglich der Basenveränderung c.505-4G>A wurde nach direkter Sequenzierung von 34 gesunden, nichtverwandten deutschen Kontrollen eine SSCP-Analyse, wie unter 2.2.3.4, Einzelstrang-Konformations-Analyse, beschrieben, etabliert und auf 125 weiteren gesunden, nichtverwandten deutschen Kontrollen durchgeführt. Dabei wurde der Patient HNA8III10 als Positivkontrolle mitgeführt. Die Zusammenfassung findet sich in Tab.15.

Abb.3.3.5.1 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt eines SSCP-Analyse-Gels.

Dabei sind die Kontrollen auf den Spuren 1-4 aufgetragen und der Patient HNA8III10 auf Spur 5.

Es ist offensichtlich zu erkennen, dass die obere Bande des Patienten HNA8III10 im Gegensatz zu den Kontrollen etwa doppelt so hoch ist. Dieser Befund war konsistent zu erheben. Der Unterschied der mittleren Bande hingegen war inkonsistent und möglicherweise abhängig von der DNA-Konzentration.

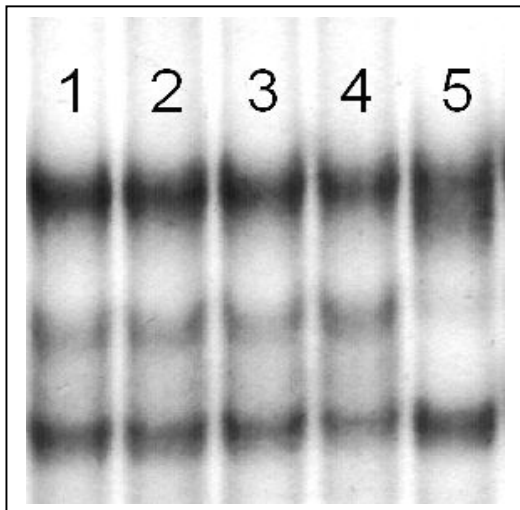


Abb.25: SSCP-Analyse zur Basenveränderung c.505-4G>A;
Kontrollen auf Spur 1-4, Patient HNA8III10 auf Spur 5.

3.3.6 Assoziation der c.505-4G>A-Transition mit HNA und dysmorphen Zeichen in der HNA8-Familie

Wie oben beschrieben, wurde die Basenveränderung c.505-4G>A auch innerhalb der HNA8-Familie bei gesunden und erkrankten Personen überprüft. Die Assoziation zwischen c.505-4G>A und HNA einerseits bzw. dysmorphen Zeichen andererseits ist in Tab.17 aufgeführt.

| Familienmitglied (siehe Stammbaum) | Transition c.505-4G>A vorhanden? | HNA-erkrankt? | Dysmorphie Zeichen? |
|--|-------------------------------------|---------------|------------------------|
| I2 | nein | nein | nein |
| II1 | nein | nein | nein |
| II2 | ja | ja | ja |
| II5 | ja | ja | ja |
| II7 | ja | ja | ja |
| II8 | nein | nein | nein |
| II9 | ja | nein | ja |
| II10 | nein | nein | nein |
| II11 | nein | nein | nein |
| II17 | ja | ja | ja |
| III1 | ja | ja | ja |
| III2 | nein | nein | nein |
| III3 | ja | ja | ja |
| III7 | nein | nein | nein |
| III8 | nein | nein | nein |
| III10 | ja | ja | ja |
| III11 | nein | nein | nein |
| III12 | nein | nein | nein |
| III13 | ja | nein | nein |
| III14 | ja | nein | nein |

Tab.17: Assoziation der c.505-4G>A-Transition mit HNA und dysmorphen Zeichen in der HNA8-Familie

4 DISKUSSION

4.1 Allgemeines

4.1.1 Bedeutung der HNA

Insbesondere unter Berücksichtigung der beobachteten Triggerfaktoren und der wahrscheinlich autoimmunen Genese könnte der HNA ein Modellcharakter für die Entstehung autoimmuner Erkrankungen zukommen.

Daher ist die Aufklärung des kausativen genetischen Defekts eine Aufgabe, die Konsequenzen über die eigentliche Erkrankung hinaus haben kann.

4.1.2 Kandidatengene

4.1.2.1 Prinzipielle Strategien zur Identifizierung von Krankheitsgenen

Für die Identifizierung von Krankheitsgenen existieren zwei prinzipielle Strategien, nämlich positionsunabhängige und positionsabhängige:

- Positionsunabhängige Verfahren: Vermutungen über Kandidatengene werden angestellt, ohne dass eine chromosomale Zuordnung des Krankheitsklokus bekannt ist. Aufgrund verschiedener möglicher funktioneller Hinweise wird die Identifikation von Kandidatengenen versucht.

So können z.B. Informationen über die Funktion eines Gens genutzt werden, um dieses zu klonieren (Funktionsspezifische Klonierung). Dabei geht man entweder vom aufgereinigten Genprodukt oder von einem Genfunktionstest aus. Ein anderer Ansatz ist der Versuch der Übertragung genetischer Informationen bei klinisch ähnlichen Erkrankungen des Menschen oder auch des Tieres. Diese Verfahren waren in der Vergangenheit nur selten erfolgreich.

- Positionelle Verfahren: Informationen über die Pathogenese einer Krankheit oder biochemische Funktionen eines Gens sind hierbei nicht notwendig. Stattdessen versucht man, den Genlokus über verschiedene

Methoden zunehmend einzugrenzen. Dabei spielt insbesondere die Kopplungsanalyse eine wichtige Rolle, wobei die Kopplung von Marker-Allelen zum Vorliegen der Erkrankung untersucht wird. Der Erfolg dieses Verfahrens zeigt naturgemäß eine starke Abhängigkeit von der Zahl der gefundenen Rekombinationen und damit der Zahl und Größe der untersuchten Familien.

Ist die Position eines Krankheitslokus ermittelt, können Kandidatengene mit Hilfe von Datenbanksuchen ermittelt werden. Dieses Verfahren ist nur sinnvoll, wenn die Kandidatenregion ausreichend eingegrenzt ist, da die Dichte beschriebener Gene in der Folge des Human-Genom-Projektes zunehmend wächst, wenngleich die Beschreibung eines Genes hierbei häufig völlig losgelöst von der Bekanntheit seiner Funktion ist.

4.1.2.2 Vorgehen zur Identifizierung von Kandidatengenen der HNA

Im Falle der HNA wurde zunächst, wie in der Einleitung beschrieben, eine positionelle Klonierung mittels Kopplungsanalysen durchgeführt. Dies führte zur Eingrenzung der Kandidatenregion auf mittlerweile etwa 2Mb.

4.1.2.3 Probleme bei der Identifizierung von Kandidatengenen der HNA

Gleichzeitig mit der beschriebenen zunehmenden Eingrenzung der Kandidatenregion wurden die Grenzen der positionellen Klonierung erreicht: Bereits aufgrund der Seltenheit der Erkrankung ist die Zahl der untersuchbaren Familien und damit die Zahl der Rekombinationen in der Kandidatenregion sehr gering. Mit fortschreitender Einengung der Kandidatenregion jedoch potenziert sich zusätzlich die Zahl nötiger Familien, die zu untersuchen wären, um weitere Rekombinationen zu finden.

Ab diesem Zeitpunkt rückte der funktionelle Ansatz zur Auswahl von Kandidatengenen auf Chromosom 17q25 zunehmend in den Vordergrund.

Auch hierbei stellten sich jedoch mehrere Probleme:

- Es ist nicht davon auszugehen, dass bereits alle Gene in dieser vergleichsweise genarmen Region identifiziert oder gar beforscht sind. Durch die Ergebnisse des „Human Genome Project“ sowie der sich ständig verbessernden Qualität von Genvorhersageprogrammen verändert sich die Zahl der vorhergesagten Gene und ihrer Transkripte zur Zeit relativ schnell. Parallel ist aber über die Funktion bzw. Expression der vermuteten Gene zumeist nichts oder nur wenig bekannt. Dies steht einem funktionellen Kandidatengen-Ansatz naturgemäß entgegen. Gleichzeitig kann so eine Situation eintreten, in der zu einem gegebenen Zeitpunkt alle bekannten und vermuteten Gene einer Region als Krankheitsgene ausgeschlossen sind und erst zu einem viel späteren Zeitpunkt, in Abhängigkeit von der Identifikation weiterer Gene, das Krankheitsgen identifiziert werden kann.
- Ein großes Problem zur Anwendung des funktionellen Kandidatengen-Ansatzes stellt weiterhin der komplexe Phänotyp sowie die ungeklärte Ätiologie der HNA dar. Prinzipiell könnte somit jedes der Gene innerhalb der Kandidatenregion für die Erkrankung ursächlich sein.
- Dennoch lassen sich die vorhandenen Gene aufgrund der angenommenen autoimmunen Pathogenese sowie der plexusbezogenen Manifestation der HNA in funktionell gute und schlechte Kandidatengene unterteilen:
 - Verschiedene Faktoren können zur Einteilung als gutes Kandidatengen führen: Hierzu zählt insbesondere eine Expression im peripheren Nervensystem oder in Zellen des Immunsystems. Weiterhin kann aber jedes Gen, das zur Regulierung antigener Eigenschaften, Zellüberleben oder Zelltod bzw. Regulierung anderer Gene verantwortlich ist, als funktionell gutes Kandidatengen eingeordnet werden.
 - Zu den schlechten Kandidatengenen zählen zunächst diejenigen, die ausschließlich in nichtneuronalen oder nichtbindegewebigen Organen oder lediglich während der Ontogenese exprimiert werden.

Mittels der eingangs beschriebenen Datenbankrecherchen wurden die drei untersuchten Kandidatengene ermittelt. Ihre Funktion und potentielle Rolle für die Auslösung der HNA werden nachfolgend erläutert.

4.1.3 Prinzipielle Betrachtung möglicher pathogener Mutationen

Verschiedene Mutationstypen kommen prinzipiell als pathogenetische Ursache der HNA in Betracht:

- Chromosomen-Mutationen wie Translokation, Deletion, Insertion und Inversion. Sie führen zur Veränderung von Form oder Struktur der Chromosomen.
- Gen-Mutationen wie Nukleotid-Austausch, Deletion oder Insertion, die zur Veränderung einzelner Nukleotide führen. Sie werden anhand ihrer Auswirkungen auf das Codon bzw. das Leseraster weiter unterteilt:

Als „stumme“ Mutation bezeichnet man den Austausch eines Nukleotids unter unveränderter Kodierung der resultierenden Aminosäure. Eine „missense“-Mutation hingegen bewirkt den Austausch der korrespondierenden Aminosäure. Unter „nonsense“-Mutation versteht man den Nukleotidaustausch, der zur Umwandlung eines Aminosäure-kodierenden Codons in ein Stop-Codon führt. Die Deletion oder Insertion von Nukleotiden hingegen führt zur Veränderung des Leserasters und wird daher als „frame shift“-Mutation bezeichnet. Der Triplet-Takt, mit dem die Information bei der Proteinsynthese übersetzt wird, bekommt so eine andere Bedeutung. Zumeist resultiert hieraus ein Protein mit abartiger Primärstruktur.

Bezüglich der gesuchten HNA-Mutationen läßt sich folgende Erwartungshaltung beschreiben:

Ausgehend vom funktionellen Verständnis sowie der Betrachtung bekannter pathogener Mutationen anderer Erkrankungen, sind exonisch lokalisierte Mutationen am wahrscheinlichsten. Hier wiederum ist die Lokalisation innerhalb der kodierenden Sequenz wahrscheinlicher als in der UTR. Dabei führt die

unterschiedliche Herkunft der Familien (Türkei, Spanien und USA) wahrscheinlich zu verschiedenen lokalisierten Defekten, wobei die Lokalisation in den US-amerikanischen Familien aufgrund eines Founder-Effektes identisch sein könnte. Insgesamt ist also wahrscheinlich mit verschiedenen lokalisierten exonischen Defekten innerhalb eines Genes zu rechnen.

Weniger wahrscheinlich sind intronische Mutationen als ursächlich zu erwarten, wie das Studium bekannter Mutationen anderer Erkrankungen zeigt. Hier existieren mehrere Typen intronischer pathogener Mutationen: Überwiegend sind dies Splice-Site-Mutationen, die zu fehlerhaftem Spleißen und zur Bildung veränderter, unvollständiger mRNA führen. Diese Defekte liegen naturgemäß im Abstand von wenigen Basen von den Exon-Intron-Grenzen und verändern in der Regel hochkonservierte Bereiche der Splice-Site. Weniger häufig sind Defekte innerhalb der hochkonservierten Branch-Site, die etwa 30b von der Splice-Acceptor-Site am 3'-Ende des Introns liegt. Lediglich ein sehr geringer Anteil intronischer pathogener Mutationen beruht auf der Generierung neuer Splice-Sites irgendwo im Intron mit resultierender mRNA-Veränderung. Auch sehr selten sind Mutationen im Promotorbereich.

Dass ein Defekt allerdings in vier verschiedenen Familien intronisch lokalisiert sein könnte, ist extrem unwahrscheinlich.

Hinsichtlich der Mutationsanalyse lassen folgende Basenkonstellation einer Basenabweichung bei den Referenzpersonen grundsätzlich den Ausschluß eines ursächlichen Zusammenhanges zur HNA zu:

- Das Vorliegen einer Basenabweichung bei Gesunden und Erkrankten.
- Das Vorliegen einer homozygoten Abweichung: Die Seltenheit der autosomal dominant vererbten HNA bedingt eine ähnliche Seltenheit des zugrundeliegenden genetischen Defektes. Daher ist nicht mit einer homozygoten Konstellation zu rechnen.

4.1.4 Fehlerquellen beim Mutationsnachweis

Generell ist aber festzuhalten, dass größere strukturelle Läsionen mit dem Verfahren der direkten Sequenzierung nicht notwendigerweise erkannt werden. So würde die intronische Duplikation oder aber auch die Deletion eines oder mehrerer Exone verfahrensbedingt unerkant bleiben.

Der Nachweis solcher Genom-Mutationen muß mit anderen Verfahren wie dem Southern-Blot gesondert in einer weiteren Arbeit geführt werden.

4.2 *Sphingosinkinase-1 (SPHK-1)*

4.2.1 Genomische Organisation von *SPHK-1*

Die ermittelte genomische Organisation von *SPHK-1* kann als sicher betrachtet werden, da die cDNA einen guten ORF zeigt und sich regelmäßig in fünf Exone aufspaltet.

4.2.2 Funktionelle Bedeutung von SPHK-1

Das Produkt der vornehmlich zytosolisch lokalisierten Sphingosinkinase (SPHK) ist Sphingosin-1-phosphat (SPP), ein bioaktiver Sphingolipid-Metabolit, der diverse biologische Prozesse sowie intra- wie auch extrazellulär reguliert (31, 98). Eine wichtige Rolle spielt SPP als second messenger bei der Regulierung von Zellwachstum und Überleben (17, 70).

Eine Reihe externer Stimuli, insbesondere Wachstums- und Survivalfaktoren, aktivieren SPHK: Hierzu gehören Platelet-Derived Growth Factor (10, 16, 70, 84), Nerve Growth Factor (24, 87), Vitamin D3 (43), muskarinische Acetylcholinagonisten (64), Tumornekrosefaktor- α (121) und einige mehr.

Intrazelluläres SPP kann nun sowohl Inositol-Triphosphat-unabhängig Kalzium aus internen Speichern mobilisieren (60, 64) als auch diverse Signalwege anregen, die zu Proliferation (85, 109) und Unterdrückung von Apoptose (17,

18, 24, 81, 109) führen. Diese Effekte lassen sich selektiv durch kompetitive Inhibitoren von SPHK blockieren (98).

Aus diesen Beobachtungen wird eine dynamische Balance zwischen dem Level der Sphingolipidmetaboliten Ceramid und SPP einerseits und entgegenwirkenden Signalwegen andererseits als wichtiger Faktor für das Schicksal von Zellen erachtet (18). Beispielsweise führt eine stressinduzierte Erhöhung der Ceramidspiegel zu Apoptose, während Survival-Faktoren über eine SPHK-Stimulierung gesteigerte SPP-Spiegel und somit eine Unterdrückung von Apoptose bewirken (18).

Den hauptsächlich funktionelle Gegenspieler der SPHK bildet die Sphingosinphosphat-Lyase, die SPP abbaut.

Zusätzliches Interesse an SPP wurde aber kürzlich durch die Entdeckung verursacht, dass es extrazellulär als Ligand an den G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptor (G-protein-coupled-receptor, GPCR) EDG (endothelial differentiation gene)-1 bindet (51, 109). EDG-1 gehört zu einer Familie von GPCRs, die SPP mit hoher Affinität und Spezifität binden (31, 99). Die EDG-1-Familie wird sehr unterschiedlich exprimiert, nämlich vornehmlich kardiovaskulär und im Nervensystem. Obwohl die biologischen Funktionen der EDG-1-Familie nicht vollständig verstanden sind, legen jüngste Studien nahe, dass die Bindung von SPP an EDG-1 Migration und Chemotaxis stimuliert (25, 110) und so Angiogenese regulieren könnte (50, 52, 110). EDG-5 wiederum könnte eine Rolle bei der zytoskelettalen Reorganisation während der Neuritenretraktion spielen, die für die neuronale Differenzierung und Entwicklung wichtig ist (57, 99).

4.2.2.1 Potentielle Rolle von *SPHK-1* für die HNA

Mehrere der genannten Wirkungen machen *SPHK-1* zu einem guten Kandidaten für HNA: Sowohl sein intrazellulärer Einfluß auf Zellwachstum und –überleben als auch seine extrazelluläre Wirkung auf die zytoskelettale Reorganisation in Kombination mit der vornehmlichen Expression von EDG-1

im Nervengewebe machen *SPHK-1* in einem pathophysiologischen Konzept zur HNA vorstellbar.

4.2.3 Mutationsanalyse von *SPHK-1*

Zunächst soll erwähnt werden, dass die detektierten Basenabweichungen gegenüber der cDNA-Referenzsequenz AF266756 in allen Referenzpersonen und Kontrollen vorhanden sind. Das Vorliegen in allen untersuchten Individuen macht eine Einstufung der Abweichungen als Sequenzierfehler von AF266756 sehr wahrscheinlich, wenngleich nicht sicher auszuschließen ist, dass es sich um seltene Insertions-Polymorphismen handelt. Bereits ihre Lage in den UTRs macht einen Zusammenhang zur HNA unwahrscheinlich. Durch ihr Vorliegen in allen untersuchten Individuen ist eine ursächliche Wirkung für die HNA aber sicher auszuschließen.

Darüber hinaus fanden sich drei weitere Abweichungen gegenüber cDNA-Referenzsequenz AF26675:

Für c.103A>G (Kor: c.104A>G) läßt sich ein ursächlicher Zusammenhang zur HNA sicher ausschließen: Einerseits wird dies bereits durch die Basenkonstellation der Referenzpersonen offensichtlich: Allein das Vorliegen homozygoter Veränderungen führt zum Ausschluß, weiter ergänzt durch die Tatsache, dass auch Gesunde die Abweichung zeigen. Andererseits zeigt auch die Allelfrequenz der 18 Kontrollen, dass es sich bei c.103A>G (Kor: c.104A>G) um einen häufigen Polymorphismus handelt (Tab.7).

Die nächste Veränderung, c.115A>G (Kor: c.116A>G), ist in der 5'-UTR gelegen, was einen pathogenetischen Zusammenhang zur HNA bereits unwahrscheinlich macht. Die Basenkonstellation der Referenzpersonen allerdings läßt noch keinen Ausschluß als ursächlichen Defekt zu: Lediglich eine erkrankte Person, HNA8III10, zeigt die Abweichung. Alle anderen Referenzpersonen besitzen ein homozygoten „A“. Klärung bringt dann die

Allelfrequenz der 18 Kontrollen (Tab.7): Auch hier handelt es sich also um einen häufigen Polymorphismus.

Obwohl die dritte Basenabweichung c.1232T>C (Kor: c.1237T>C) im Gegensatz zu den vorherigen nicht nur exonisch, sondern auch in der kodierenden Sequenz gelegen ist, führt sie als „Dritte-Base-Mutation“ nicht zum Austausch einer AS. Aber auch in diesem Fall läßt bereits die Basenkonstellation der Referenzpersonen eine klare Aussage zu: Mit 4003-30 zeigt auch ein Gesunder die Veränderung, was einen Ausschluß ermöglicht. Unterstützt wird dies außerdem durch die Allelfrequenz der 18 Kontrollpersonen, die beweist, dass es sich auch bei c.1232T>C (Kor: c.1237T>C) um einen häufigen Polymorphismus handelt (Tab.7). Auch die Analyse des UniGene-Cluster Hs.68061 beweist das Vorliegen eines Polymorphismus (Tab.8).

Zusammenfassend läßt sich also *SPHK-1* als Kandidatengen für HNA mit höchster Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Unter 4.5 wird diskutiert, warum ein absolut sicherer Ausschluß prinzipiell nicht geführt werden kann.

4.3 *Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)*

4.3.1 Genomische Organisation von *TIMP2*

Wie in 3.2.1 beschrieben, läßt sich aufgrund von Lücken im BAC-Klon AC025609 nur ein Teil der cDNA von *TIMP2*, nämlich 641b des 3'-Endes, an diesen anlagern. Die ersten 431b bleiben unzugeordnet. Da der putative ORF an Position 303 beginnt, betrifft dies die ersten 128b des ORF. Auch an andere BAC-Klone lagert sich die cDNA nicht an. Es muß also mindestens ein weiteres Exon geben, das sich erst dann lokalisieren läßt, wenn die Lücken in der genomischen Sequenz geschlossen sind.

Dennoch läßt sich die Wahrscheinlichkeit, aus diesem Grund *TIMP2* als Krankheitsgen für HNA zu übersehen, als gering einschätzen, da dies die Lokalisation aller Mutationen der vier untersuchten Familien in Exon 1 zur Voraussetzung hätte.

Allerdings kann die Mutationsanalyse von *TIMP2* deswegen nicht als endgültig abgeschlossen betrachtet werden.

4.3.2 Funktionelle Bedeutung von *TIMP2*

4.3.2.1 Allgemeine funktionelle Bedeutung von *TIMP2*

Extrazellulär Matrixkomponenten modulieren zelluläres Verhalten durch die Ausbildung einer einflußnehmenden zellulären Umgebung. Dergestalt ist der Umsatz der extrazellulären Matrix ein integraler Bestandteil von Entwicklung, Morphogenese und Gewebsumbildung. Obwohl mannigfaltige Proteasen am Matrix-Umsatz beteiligt sind, kommt den MMPs, auch Matrixine genannt, die Hauptrolle als Matrix-abbauende Proteinase zu (69). Folglich sind MMPs an vielen normalen biologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel dem weiblichen Zyklus, Fetal- und Embryonalentwicklung, Organmorphogenese, Knochenumbau und Wundheilung (76).

Die Expression der meisten MMPs ist transkriptionell durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, Zellmatrix, Zell-Zell-Interaktionen und zelluläre Transformationen geregelt.

MMPs agieren primär auf der Zelloberfläche oder im Extrazellulärraum. Ihre Aktivität wird kontrolliert über eine Kombination aus Zymogen-Aktivierung und endogenen Hemmstoffen. Zu letzteren zählen α 2-Makroglobuline und TIMPs. Während die α 2-Makroglobuline und ihnen verwandte Inhibitoren vornehmlich als Regulatoren in Körperflüssigkeiten wirken, sind TIMPs die Hauptinhibitoren im Gewebe.

TIMPs von Säugetieren besitzen zwei Domänen, eine N-terminale von 125 Aminosäuren und eine kleinere C-terminale von 65 Aminosäuren (116). Isolierte N-terminalen Domänen sind in der Lage, ein stabiles natives Molekül mit inhibitorischen Eigenschaften gegenüber MMPs zu bilden (36, 66, 115).

Gegenwärtig sind vier TIMPs (TIMP-1 bis TIMP-4) bei Vertebraten identifiziert und homologe Inhibitoren wurden auch bei *Drosophila* (83) und *Caenorhabditis elegans* (12) gefunden.

Obwohl TIMPs eng an die meisten MMPs binden (56, 67) wurde über einige Unterschiede hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung berichtet, die sich durch Aminosäuresubstitutionen in den funktionellen Domänen erklären lassen (12). Leider gibt es bisher keine umfassenden quantitativen Vergleiche der inhibitorischen Effekte verschiedener TIMPs gegenüber verschiedenen MMPs, da diesbezügliche Unterschiede wichtige biologische Auswirkungen hätten.

Wie bei den MMPs steuern Kontrollmechanismen die Gewebsexpression der TIMPs während physiologischer Bedingungen oder Gewebsumbildung, um eine Balance im Metabolismus der Extrazellulärmatrix zu gewährleisten (19, 32).

Eine Unterbrechung dieser Balance könnte zu Krankheiten führen, die mit einem unkontrollierten Matrixumsatz verknüpft sind, wie Arthritis, Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, Nephritis, Gewebsulzerationen, Fibrose und neurologische Erkrankungen (68, 119).

4.3.2.2 MMPs und periphere Neuropathien

Bei verschiedenen zentralen und peripheren neurologischen Erkrankungen autoimmuner Genese ist eine Beteiligung von MMPs bereits bekannt. Im Folgenden soll besonders auf die peripheren Neuropathien kurz eingegangen werden:

4.3.2.2.1 In-vitro-Beobachtungen

Kürzliche in-vitro-Studien legen nahe, dass MMPs an mindestens zwei Prozessen der Pathogenese inflammatorischer demyelinisierender Neuropathien beteiligt sind:

MMP-9, auch Gelatinase B genannt, scheint die Migration von T-Lymphozyten über die Basalmembran zu fördern (54). Dies impliziert eine wichtige Rolle der MMPs für die T-Zell-Migration aus dem Blut ins periphere Nervensystem (PNS). MMPs scheinen am Prozeß der Demyelinisierung beteiligt zu sein. P0, eine Proteinkomponente des peripheren Myelins, ist ein Substrat proteolytischer MMP-Aktivität (14).

Zunehmend ergeben sich Hinweise über Einfluß von MMPs auf die Expression des Zelltod-Signalmoleküls FasL (58).

4.3.2.2.2 Beobachtungen an Tiermodellen

Die experimentelle autoimmune Neuritis (EAN) ist ein Modell für inflammatorische demyelinisierende Erkrankungen des PNS. Auf diesem Modell gründende Beobachtungen verstärken den Hinweis, dass MMPs an vielen Stationen den Schlüssel zur Pathogenese inflammatorischer Demyelinisierung bilden (75). Bei der EAN fand sich eine selektive mRNA-Hochregulierung von MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-12 während der initialen Phase der Erkrankung sowie ein Erreichen von Höchstwerten genannter MMPs während maximaler klinischer Ausprägung der Erkrankung (37, 41). Weiterhin ließ sich der Schweregrad der EAN durch die Gabe synthetischer MMP-Inhibitoren vom Beginn der Symptomatik an abschwächen (86).

Die Expression von MMP-7 blieb während der Erholungsphase hochreguliert, was auf eine mögliche Rolle dieser MMP für die Wiederherstellung des PNS hindeutet.

4.3.2.2.3 MMPs bei inflammatorischen peripheren Neuropathien

Die verdächtigsten Pathomechanismen zur Genese inflammatorischer demyelinisierender Erkrankungen umfassen sowohl humorale als auch zelluläre Signalwege (35). Histopathologische Kennzeichen dieser Erkrankungen sind Demyelinisierung und mononukleäre Zellinfiltration (5).

In N. suralis-Biopsien von Guillain-Barré-Syndrom (GBS)-Patienten fand sich eine erhöhte mRNA-Expression von MMP-9 und MMP-7, die mit gesteigerter gelatinolytischer (MMP-2 und MMP-9 heißen auch Gelatinase A bzw. B) Aktivität assoziiert war (41). Auch im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose sowie anderen entzündlichen Erkrankungen ließ sich eine erhöhte Aktivität von MMP-9 nachweisen (30).

Darüberhinaus fand sich kürzlich auch bei Patienten mit Chronisch Inflammatorischer Demyelinisierender Polyradikuloneuropathie eine verstärkte Reaktivität von MMP-2 und MMP-9 in Biopsien des N. suralis (53).

Nichtsdestotrotz darf man darüber nicht vergessen, dass MMPs, wie im EAN-Modell gezeigt, auch günstige Wirkungen auf die Regeneration des PNS haben könnten.

4.3.2.3 Potentielle Rolle von TIMP2 für die HNA

Bereits die generelle Funktion von TIMPs als Matrix-abbauende Proteinase bei multiplen biologischen Prozessen in diversen Geweben ließen TIMP in einen pathophysiologischen Kontext zur HNA passen.

Weiter gesteigert wird die Bedeutung von *TIMP2* als Kandidatengen jedoch durch die dargestellte Rolle der MMPs und dadurch sekundär auch der TIMPs bei peripheren Neuropathien autoimmuner Genese.

Dass auch die HNA, wie berichtet, mononukleäre Zellinfiltrate um die betroffenen Nerven zeigt (siehe 1.1.7.3, Histopathologische Befunde der HNA) und wahrscheinlich autoimmuner Genese ist, macht *TIMP2* zum idealen Kandidatengen.

4.3.3 Mutationsanalyse von *TIMP2*

Insgesamt fanden sich zwei Basenabweichungen gegenüber der Referenz-cDNA NM_003255:

Erstens fand sich c.605G>A. Wie beschrieben liegt diese Veränderung im Exon 3 innerhalb der kodierenden Sequenz, führt aber als „Dritte-Base-Veränderung“ nicht zum Austausch einer AS. Die Basenkonstellation der Referenzpersonen läßt c.605G>A zunächst sehr interessant erscheinen. Beide Betroffene sind Erkrankte aus verschiedenen amerikanischen Familien. Wie eingangs beschrieben, könnten die amerikanischen Familien tatsächlich aufgrund eines Founder-Effektes einen gemeinsamen Defekt zeigen. Die Untersuchung der Allelfrequenz in 18 Kontrollpersonen jedoch zeigt, dass es sich bei c.605G>A um einen weiteren Polymorphismus handelt (Tab.11). Dieses Ergebnis wird bestätigt durch die Analyse des UniGene-Cluster Hs.325495 (Tab.12).

Hinsichtlich der zweiten Veränderung c.768-151C>T im Intron 4 läßt allein schon die Analyse der Basenkonstellation der Referenzpersonen eine klare Bewertung zu: Zum einen zeigen gesunde Referenzpersonen die heterozygote Abweichung, was für sich genommen bereits für einen Ausschluß genügt. Zum anderen sind zusätzlich drei Personen homozygot für die Veränderung. Auch dies erlaubt, wie beschrieben, den Ausschluß als pathogener Defekt. Es handelt sich bei c.768-151C>T also auch um einen Polymorphismus.

Bezüglich der bekannten Exone kann *TIMP2* also zusammenfassend mit hoher Wahrscheinlichkeit als Kandidatengen für HNA ausgeschlossen werden. Wie in 4.3.1 aber bereits diskutiert konnte das putative Exon 1 aufgrund von Sequenzlücken bisher nicht detektiert und untersucht werden.

Unter 4.5 wird diskutiert, warum ein absolut sicherer Ausschluß jedoch prinzipiell nicht geführt werden kann.

4.4 *Lymphocyte activated killer cells (LAK)-4P*

4.4.1 Genomische Organisation von *LAK-4P*

Die ermittelte genomische Organisation von *LAK-4P* kann als sicher betrachtet werden, da die cDNA AB002405 einen guten ORF zeigt und sich regelmäßig in zwölf Exone aufspaltet.

Wie in 4.5 diskutiert, besteht aber prinzipiell die Möglichkeit weiterer unbekannter Genprodukte, zum Beispiel durch alternatives Spleißen. Dies trifft umso mehr für Gene mit höherer Exonzahl zu.

4.4.2 Funktionelle Bedeutung von *LAK-4P*

Neben der berichteten Schilderung einer verstärkten Expression von *LAK-4P* im lymphoiden Gewebe des Menschen im Zusammenhang mit der Aktivierung von T- und LAK-Zellen durch von Abe et al. (2) existieren keine weitere Veröffentlichungen zu *LAK-4P*. Seine weitere Lokalisation, Expression und Funktion sind somit vollkommen unbekannt!

4.3.2.3 Potentielle Rolle von *LAK-4P* für die HNA

Trotz der spärlichen Informationen zu *LAK-4P* erscheint das Gen aufgrund seiner anzunehmenden Funktion im Immunsystem sowie aufgrund seiner Expression in aktivierten T- und LAK-Zellen als ideales Kandidatengen.

4.4.3 Mutationsanalyse von *LAK-4P*

Durch die höhere Exonzahl fanden sich bei der Sequenzierung von *LAK-4P* auch mehr genetische Veränderungen gegenüber der Referenz-cDNA AB002405 als bei den zuvor diskutierten Genen:

Wie in 3.3.3, Mutationsanalyse und Kontrollen von *LAK-4P*, beschrieben wurden vier der 14 detektierten Basenabweichungen ausschließlich bei gesunden Kontrollen gefunden. Drei davon liegen exonisch und eine intronisch. Sie stehen somit offensichtlich in keinem Zusammenhang zur HNA. Ihre Allelfrequenz ist in Tab.15 aufgeführt. Es handelt sich also sicher um Polymorphismen. Dies wird für die Veränderungen c.451C>T und c.919C>T auch durch die Analyse des zugehörigen UniGene-Cluster Hs.16165 bestätigt (Tab.16).

Die restlichen genetischen Veränderungen sollen im Folgenden diskutiert werden:

Erstens fand sich c.51+5T>C im Intron 1. Obgleich die Veränderung intronisch gelegen ist, könnte sie aufgrund ihrer Nähe zur Exon-Intron-Grenze Veränderungen der Splice-Site bewirken. Die Basenkonstellation der Referenzpersonen erscheint zunächst sehr interessant: Es gibt keine homozygoten, sondern nur heterozygote Veränderungen. Diese betreffen zwei amerikanische Patienten aus den Familien 4003 und 4004. Die Kontrollperson 4003-30 aus der Familie 4003 ist unauffällig.

Klarheit schafft jedoch die Analyse der Allelfrequenzen in der Kontrollgruppe von 19 Personen (Tab.15): Bei c.51+5T>C handelt es sich offensichtlich um einen häufigen Polymorphismus.

Die zweite Veränderung c.476G>A, die zum AS-Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin (D138N) führt, wurde ausschließlich in einer der gesunden Referenzpersonen im Exon 4 beobachtet. Somit ist ein Zusammenhang zur HNA sicher auszuschließen. Dennoch handelt es sich sicherlich nicht um einen häufigen Polymorphismus, da sie sich weder bei 67 direkt sequenzierten Kontrollen (Tab.15) noch bei 17 Kontrollen im zugehörigen UniGene-Cluster Hs.16165 findet.

Ob der AS-Austausch Konsequenzen für die betroffene Person hat, läßt sich nicht beurteilen. Möglicherweise bleibt er durch die biochemische Verwandtschaft der beiden AS jedoch ohne Auswirkungen.

Die dritte Basenveränderung c.505-4G>A im Intron 4 liegt in sehr kurzem Abstand zur Intron-Exon-Grenze und könnte somit Auswirkungen auf die hochkonservierte Region der Splice-Site haben. Sie findet sich ausschließlich in heterozygoter Form bei der erkrankten Referenzperson aus der spanischen Familie HNA8.

Nachdem die üblicherweise durchgeführte Zahl von 18 Kontrollen keinen Hinweis auf einen Polymorphismus gab, wurde sie auf 36 gesteigert. Auch hier fand sich die Basenveränderung c.505-4G>A nicht (Tab.15).

Daraufhin wurde mittels SSCP-Analyse (Abb.25) die Zahl der Kontrollen um weitere 125 Personen erhöht. Auch in dieser Gruppe fand sich niemand mit der genannten Veränderung (Tab.15).

Unter der Vorstellung, dass es sich bei c.505-4G>A um einen ethnisch-spezifischen Polymorphismus handeln könnte, wurde weiterhin eine Kontrollgruppe von 50 gesunden spanischen Patienten mittels direkter Sequenzierung untersucht. Auch hier fand sich die Veränderung nicht (Tab.15). Insgesamt konnte die Basenänderung c.505-4G>A also bei 211 Kontrollen nicht detektiert werden.

In der Folge wurden weitere Mitglieder der HNA8-Familie (siehe Stammbaum, Abb. 11) auf die Mutation c.505-4G>A untersucht. Es wurde die Assoziation von c.505-4G>A mit dysmorphen Zeichen bzw. der HNA-Erkrankung detektiert (Tab.17). Hierbei zeigte sich, dass insgesamt drei Familienmitglieder (HNA8II9 sowie deren Söhne HNA8III13 und HNA8III14) die Mutation tragen ohne an HNA erkrankt zu sein. Betrachtet man lediglich die Assoziation von c.505-4G>A mit dysmorphen Zeichen findet sich, abgesehen von den genannten Personen HNA8III13 und HNA8III14, diese Assoziation innerhalb der restlichen HNA8-Familie. Somit läßt sich die Mutation c.505-4G>A auch nicht als Assoziationsmarker für dysmorphe Zeichen innerhalb der Familie betrachten.

Aufgrund der nicht vorhandenen Assoziation der Mutation c.505-4G>A mit HNA bei drei Personen innerhalb der HNA8-Familie läßt sich ein pathogener Effekt derzeit ausschließen.

Dennoch wäre vorstellbar, dass es sich bei der Person HNA8II9 um einen gesunden Überträger handelt und seine beiden Söhne HNA8III13 und HNA8III14, die sich im Jugendalter befinden, noch nicht erkrankt sind, aber zu einem späteren Zeitpunkt noch erkranken werden. In diesem Fall stünde die Mutation c.505-4G>A in einem neuen Kontext und gewänne hohe Bedeutung.

Um dieser Möglichkeit weiter Rechnung zu tragen, wird regelmäßiger Kontakt mit dem behandelnden Arzt gehalten (Prof. Pou-Serradell, Universität Barcelona, Spanien).

Vorausgesetzt, *LAK-4P* wäre das Krankheitsgen der HNA, so wäre natürlich zu fordern, dass sich nicht nur in der HNA8-Familie ein pathogener Defekt zeigt. Das Fehlen von Mutationen in den anderen Erkrankten macht es zusätzlich unwahrscheinlich, dass c.505-4G>A tatsächlich pathogene Wirkungen verursacht. Andererseits ist vorstellbar, dass weitere Transkripte von *LAK-4P* existieren, die zur Zeit noch unbekannt sind. In diesen wiederum könnten Defekte der übrigen Erkrankten lokalisiert sein.

Bis zum eventuellen Eintreten der geschilderten, unwahrscheinlichen Situation muß ein pathogenetischer Zusammenhang von c.505-4G>A mit HNA jedoch als ausgeschlossen betrachtet werden.

Als vierte Abweichung wurde c.780+25G>A im Intron 6 gefunden.

Auch hier schafft die Basenkonstellation der Referenzpersonen bereits Klarheit: Zum einen zeigt sich, dass keine der untersuchten Personen an Position c.780+25 ein G aufweist. Zum anderen zeigen mehrere Personen an dieser Position ein homozygoten „A“. Beides zusammen läßt bereits auf einen Polymorphismus schließen. Diese Auffassung wird bestätigt durch die Untersuchung der Allelfrequenzen in 29 Kontrollpersonen, die zeigt, dass beide Allele etwa gleich verteilt sind (Tab.15).

Fünftens fand sich c.780-54A>T im Intron 7. Auch hier läßt die Basenkonstellation der Referenzpersonen bereits erkennen, dass es sich um einen weiteren Polymorphismus handelt: Vier der untersuchten Personen sind homozygot für die Veränderung, darunter Erkrankte und Gesunde. Auch die Untersuchung der Allelfrequenzen bei 29 Kontrollen bestätigt dies (Tab.15): Es handelt sich um einen Polymorphismus, dessen Frequenz für das Allel „T“ sogar häufiger ist als für „A“.

Als sechste Basenabweichung, ebenfalls im Intron 7, wurde c.856+77A>C detektiert. Die Konstellation der Referenzpersonen beweist auch hier einen Polymorphismus. Keine der untersuchten Personen zeigt die Referenzbase „A“, aber vier sind homozygot für „C“, darunter Kranke und Gesunde. Auch hier bestätigt die Analyse der Allelfrequenzen in der 29-köpfigen Kontrollgruppe (Tab.15) den Polymorphismus, dessen Allel „C“ etwa doppelt so häufig wie „A“ ist.

Siebtens wurde, auch im Intron 7, die Basenveränderung c.856+89C>G gefunden. Auch hier gibt allein die Basenkonstellation der untersuchten Personen bereits Aufschluß: Zwar sind mit 4003-31 und 4004-14 zwei amerikanische Patienten heterozygot betroffen, doch zeigen die restlichen vier Referenzpersonen eine Homozygotie für „G“ an Position c.856. Nimmt man die Untersuchung der Allelfrequenz in der 29-köpfigen Kontrollgruppe hinzu (Tab.15), ist offensichtlich, dass auch c.856+89C>G ein häufiger Polymorphismus ist.

Ebenso im Intron 7 wurde die Änderung c.856+111A>G ermittelt. Wiederum gibt die Basenkonstellation der Referenzpersonen klare Auskunft: Zwar sind wiederum zwei amerikanische Patienten heterozygot für die Abweichung, aber ebenso zeigen die übrigen vier Personen eine Homozygotie für „G“. Gemeinsam mit der Betrachtung der Allelfrequenz der 29 Kontrollpersonen (Tab.15) beweist dies gleichermaßen das Vorliegen eines Polymorphismus.

Abermals im Intron 7 wurde neuntens die Basenabweichung c.856+189T>C entdeckt. Im Gegensatz zu den vorherigen Funden erscheint die Analyse der Basenkonstellation der Referenzpersonen jedoch zunächst interessant: Niemand ist homozygot betroffen und heterozygot zeigen lediglich die beiden amerikanischen Patienten 4003-30 und 4004-14 die Veränderung. Ein Blick auf die Allelfrequenz der Kontrollpersonen (Tab.15) beweist jedoch, dass es sich auch hier um einen, wenngleich gelegentlichen, Polymorphismus handelt.

Die letzte aufgefundene Veränderung ist c.938+11C>T. Sie ist nur elf Basen von der Exon-Intron-Grenze gelegen und könnte daher noch Auswirkungen auf die Splice-Site haben. Auch die Basenkonstellation der Referenzpersonen ist interessant: Lediglich der Erkrankte HNA8III10 zeigt die Abweichung in heterozygoter Form. Allerdings beweist die Untersuchung der Allelfrequenzen an 23 Kontrollen (Tab.15), dass es sich um einen seltenen Polymorphismus handelt.

Zusammenfassend handelt es sich bei fast allen der aufgeführten Basenabweichungen um Polymorphismen. Eine pathogenetische Bedeutung für die HNA ist somit auszuschließen.

4.5 Mögliche Fehlerquellen und Probleme

Neben dem bereits diskutierten verfahrensimmanenten Problem, dass gewisse strukturelle Mutationen durch direkte Sequenzierung nicht detektiert werden können, können weitere Fehlerquellen nicht restlos beseitigt werden: Auch wenn bei allen detektierten Mutationen eine pathogenetischen Bedeutung für die HNA sicher ausgeschlossen werden konnte, läßt sich daraus nicht der absolut sichere Ausschluß des betreffenden Gens als Krankheitsgen ableiten.

Hierfür sind mehrere Faktoren verantwortlich:

- Erstens bleibt generell die Möglichkeit bestehen, dass tief intronisch oder in Promotorstrukturen gelegene Mutationen nicht gefunden werden. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist jedoch als extrem gering einzustufen. Sie hätte

nämlich zur Voraussetzung, dass diese Mutationen sowohl pathogen wirksam als auch in allen vier untersuchten Familien in den genannten Regionen lokalisiert wären. Aus diesem Grunde wurde die Auswahl von Personen aus vier unterschiedlichen Familien getroffen.

- Zweitens besteht prinzipiell die Möglichkeit weiterer, aktuell nicht identifizierter Genprodukte des untersuchten Gens. So können durch verschiedene Mechanismen wie alternatives Spleißen, alternative Promotoren oder alternative Polyadenylierung verschiedene Produkte synthetisiert werden. Dabei können Bereiche, die zuvor als intronisch eingestuft wurden, als Exone fungieren. Um auch dieses Problem möglichst gering zu halten wurden und werden einerseits Datenbanken regelmäßig nach weiteren Transkripten durchsucht und andererseits auch alle detektierten intronischen Mutationen anhand von Kontrollen überprüft.

Zusammenfassend ist daher die Wahrscheinlichkeit, kausale genetische Defekte für die HNA in den untersuchten Genen, übersehen zu haben, als sehr gering einzustufen. Nichtsdestotrotz läßt sich aus den genannten prinzipiellen Gründen kein absoluter Ausschluß führen.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Drei Gene wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihren Zusammenhang zur HNA untersucht: *SPHK1*, *TIMP2* und *LAK-4P*.

4.6.1 Zusammenfassung

SPHK1 konnte als Kandidatengen ausgeschlossen werden.

Für *TIMP2* ist das putative erste Exon aufgrund von Lücken in der genomischen Sequenz derzeit noch nicht analysierbar; die übrigen vier Exone samt der Exon-Intron-Übergänge konnten jedoch hinsichtlich einer pathogenen Bedeutung für die HNA ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit,

aufgrund des unbekanntes ersten Exons, *TIMP2* als Kandidatengen nicht zu erfassen, ist jedoch, wie bereits geschildert, sehr gering, da dies zur Voraussetzung hätte, dass die pathogenen Defekte aller vier untersuchten Personen im Exon 1 lokalisiert wären. Somit läßt sich auch nach derzeitigem Kenntnisstand als Kandidatengen für HNA ausschließen.

LAK-4P stellte das größte der untersuchten Gene dar. Seine Sequenzierung erbrachte die meisten Basenabweichungen, von denen lediglich c.505-4G>A mittels 211 durchgeführter Kontrollen nicht offensichtlich als Polymorphismus detektiert werden konnte. Dennoch läßt sich diese Mutation aufgrund der fehlenden Assoziation mit der Erkrankung bei drei Familienmitgliedern derzeit, wie geschildert, als pathogener Defekt ausschließen. Diese drei Personen sind eine Mutter mit ihren zwei Söhnen. Um den genannten Sonderfall auszuschließen, dass es sich bei der Mutter um eine Konduktorin handelt und ihre Söhne erst im Verlauf ihres weiteren Lebens erkranken werden, wird regelmäßiger Kontakt mit dem behandelnden Arzt gehalten. Derzeit muß die Mutation c.505-4G>A jedoch als seltener Polymorphismus gedeutet werden. Somit läßt sich auch *LAK-4P* nach derzeitigem Kenntnisstand als Kandidatengen für HNA ausschließen.

4.1.2 Ausblick

Aufgrund der sehr wahrscheinlichen autoimmunen Genese der HNA kann die Identifikation des HNA-Krankheitsgenes nicht nur Grundlagen zum Verständnis der HNA selber bieten, sondern die Tür zu einem eigenen Forschungsfeld aufstoßen: Den genetischen Grundlagen autoimmuner peripherer Neuropathien. Eventuell könnten hieraus sogar Erkenntnisse für die Pathogenese zentraler autoimmuner Neuropathien erwachsen.

Gleichzeitig mit der Identifikation pathogenetischer Mechanismen bieten sich natürlich auch Optionen für den Ansatz therapeutischer Maßnahmen.

Somit stellt die Identifikation des HNA-Krankheitsgenes natürlich einen Meilenstein in der Erforschung der Krankheit dar.

Um zu diesem Punkt zu gelangen, stehen zwei wesentliche Optionen zur Verfügung:

- Die weitere Verkleinerung der HNA-Region mittels Kopplungsanalyse. Hierzu ist jedoch die klinische und genetische Identifikation weiterer HNA-Familien unumgänglich. Dieses Ziel wird derzeit auch konkret weiter verfolgt.
- Die Identifikation und der Ausschluß weiterer Gene innerhalb der HNA-Region. Mit zunehmendem Ausschluß von Genen steigt die Wahrscheinlichkeit, das Krankheitsgen zu finden. Parallel müssen bereits untersuchte Gene auf neu detektierte Transkripte bzw. Exone untersucht werden, in denen sich der genetische Defekt verbergen könnte. Auch diese Ziele werden derzeit weiter verfolgt.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269 (2): 192-200., 1972.
2. Abe Y, Takaoka Y. Homo sapiens mRNA for LAK-4p, complete cds: GenBank
3. Airaksinen EM, Iivanainen M, Karli P, Sainio K, Haltia M. Hereditary recurrent brachial plexus neuropathy with dysmorphic features. *Acta Neurol Scand* 71 (4): 309-16., 1985.
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3): 403-10., 1990.
5. Arnason BGW, Soliven B. *Peripheral Neuropathy*. Vol. 3. Philadelphia, PA, USA: Saunders, p. 1437-1497, 1993.
6. Arts WF, Busch HF, Van den Brand HJ, Jennekens FG, Frants RR, Stefanko SZ. Hereditary neuralgic amyotrophy. Clinical, genetic, electrophysiological and histopathological studies. *J Neurol Sci* 62 (1-3): 261-79., 1983.
7. Aver'ianov IN, Iakhno NN, Nechkina NP. [Familial neuralgic amyotrophy]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 92 (3): 33-4, 1992.
8. Bardos V, Samodska V. Epidemiologic study of a brachial plexus neuritis outbreak in northeast Czechoslovakia. *World Neurol* 2: 973-979, 1961.
9. Boguski MS, Schuler GD. ESTablishing a human transcript map. *Nat Genet* 10 (4): 369-71., 1995.
10. Bornfeldt KE, Graves LM, Raines EW, Igarashi Y, Wayman G, Yamamura S, Yatomi Y, Sidhu JS, Krebs EG, Hakomori S, et al. Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J Cell Biol* 130 (1): 193-206., 1995.
11. Boulikas T, Hancock R. A highly sensitive technique for staining DNA and RNA in polyacrylamide gels using silver. *J Biochem Biophys Methods* 5 (4): 219-28., 1981.

12. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477 (1-2): 267-83., 2000.
13. Burks C, Cassidy M, Cinkosky MJ, Cumella KE, Gilna P, Hayden JE, Keen GM, Kelley TA, Kelly M, Kristofferson D. GenBank: National Center for Biotechnology Information (NCBI), 1991.
14. Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 201 (3): 223-6., 1995.
15. Chapman CR, Casey KL, Dubner R, Foley KM, Gracely RH, Reading AE. Pain measurement: an overview. *Pain* 22 (1): 1-31., 1985.
16. Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 270 (40): 23305-9., 1995.
17. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381 (6585): 800-3., 1996.
18. Cuvillier O, Rosenthal DS, Smulson ME, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* 273 (5): 2910-6., 1998.
19. Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet* 21 (1): 44-54, 1997.
20. De Clerck Y, Szpirer C, Aly MS, Cassiman JJ, Eeckhout Y, Rousseau G. The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics* 14 (3): 782-4., 1992.
21. Dreschfeld J. On some of the rarer forms of muscular atrophies. *Brain* 9: 178-195, 1886.

22. Dunn HG, Daube JR, Gomez MR. Heredofamilial brachial plexus neuropathy (hereditary neuralgic amyotrophy with brachial predilection) in childhood. *Dev Med Child Neurol* 20 (1): 28-46., 1978.
23. Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15 (1): 7-12, 2000.
24. Edsall LC, Pirianov GG, Spiegel S. Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci* 17 (18): 6952-60., 1997.
25. English D, Kovala AT, Welch Z, Harvey KA, Siddiqui RA, Brindley DN, Garcia JG. Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res* 8 (6): 627-34., 1999.
26. Erikson A. Hereditary syndrome consisting in recurrent attacks resembling brachial plexus neuritis, special facial features, and cleft palate. *Acta Paediatr Scand* 63 (6): 885-8., 1974.
27. Florea L, Hartzell G, Zhang Z, Rubin GM, Miller W. A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res* 8 (9): 967-74., 1998.
28. Gardner JH, Maloney W. Hereditary brachial and cranial neuritis genetically linked with ocular hypotelorism and syndactyly. *Neurology* 18 (3): 278., 1968.
29. Geiger LR, Mancall EL, Penn AS, Tucker SH. Familial neuralgic amyotrophy. Report of three families with review of the literature. *Brain* 97 (1): 87-102., 1974.
30. Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 41 (1): 29-34., 1992.

31. Goetzi EJ, An S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Faseb J* 12 (15): 1589-98., 1998.
32. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74 (2): 111-22., 1997.
33. Guillozet N, Mercer RD. Hereditary recurrent brachial neuropathy. *Am J Dis Child* 125 (6): 884-7., 1973.
34. Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock AM, Schmutte C, Henriot P, DeClerck YA. Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem* 271 (41): 25498-505., 1996.
35. Hartung HP, Willison H, Jung S, Pette M, Toyka KV, Giegerich G. Autoimmune responses in peripheral nerve. *Springer Semin Immunopathol* 18 (1): 97-123, 1996.
36. Huang W, Suzuki K, Nagase H, Arumugam S, Van Doren SR, Brew K. Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. *FEBS Lett* 384 (2): 155-61., 1996.
37. Hughes PM, Wells GM, Clements JM, Gearing AJ, Redford EJ, Davies M, Smith KJ, Hughes RA, Brown MC, Miller KM. Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis. *Brain* 121 (Pt 3): 481-94., 1998.
38. Jacob J, Andermann F, Robb J. Heredofamilial neuritis with brachial predilection. *Neurology* 11 (1): 1025-1033, 1961.
39. Jeannet PY, Watts GD, Bird TD, Chance PF. Craniofacial and cutaneous findings expand the phenotype of hereditary neuralgic amyotrophy. *Neurology* 57 (11): 1963-1968., 2001.
40. Kalikin LM, George RA, Keller MP, Bort S, Bowler NS, Law DJ, Chance PF, Petty EM. An integrated physical and gene map of human distal chromosome 17q24-proximal 17q25 encompassing multiple disease loci. *Genomics* 57 (1): 36-42., 1999.

41. Kieseier BC, Clements JM, Pischel HB, Wells GM, Miller K, Gearing AJ, Hartung HP. Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 43 (4): 427-34., 1998.
42. Klein C, Dyck P, FriedenberG S, Burns T. Mechanistic insights and biopsy evidence for an immune-inflammatory component in hereditary brachial neuropathy. In: *Peripheral Nerve Society 2001 Meeting*, Telf, Austria, 2001.
43. Kleuser B, Cuvillier O, Spiegel S. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell death in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res* 58 (9): 1817-24., 1998.
44. Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 273 (37): 23722-8., 1998.
45. Kuhlénbaumer G, Meuleman J, Schirmacher A, Stögbauer F, Ringelstein EB, Wehnert M, Hoeltzenbein M, Broeckhoven CV, Timmerman V. Mutation analysis of a putative sialyltransferase gene, the SFRS2 splicing factor gene and the c-myb ET-locus in two families with hereditary neuralgic amyotrophy (HNA). *Ann Hum Genet* 62 (Pt 5): 397-400., 1998.
46. Kuhlénbaumer G, Meuleman J, De Jonghe P, Falck B, Young P, Hunermund G, Van Broeckhoven C, Timmerman V, Stögbauer F. Hereditary Neuralgic Amyotrophy (HNA) is genetically heterogeneous. *Journal of Neurology* 248 (10): 861-865, 2001.
47. Kuhlénbaumer G, Schirmacher A, Meuleman J, Tissir F, Del-Favero J, Stögbauer F, Young P, Ringelstein B, Van Broeckhoven C, Timmerman V. A sequence-ready BAC/PAC contig and partial transcript map of approximately 1.5 Mb in human chromosome 17q25 comprising multiple disease genes. *Genomics* 62 (2): 242-50., 1999.
48. Kuhlénbaumer G, Stögbauer F, Timmerman V, De Jonghe P. Diagnostic guidelines for hereditary neuralgic amyotrophy or hereditary familial neuritis

- with brachial plexus predilection. On behalf of the European CMT Consortium. *Neuromuscul Disord* 10 (7): 515-7., 2000.
49. Kukita Y, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat* 10 (5): 400-7, 1997.
 50. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99 (3): 301-12., 1999.
 51. Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279 (5356): 1552-5., 1998.
 52. Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264 (3): 743-50., 1999.
 53. Leppert D, Hughes P, Huber S, Erne B, Grygar C, Said G, Miller KM, Steck AJ, Probst A, Fuhr P. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology* 53 (1): 62-70., 1999.
 54. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 154 (9): 4379-89., 1995.
 55. Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275 (26): 19513-20., 2000.
 56. Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang QA, Shi YE. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem* 272 (33): 20479-83., 1997.
 57. Maclennan AJ, Marks L, Gaskin AA, Lee N. Embryonic expression pattern of H218, a G-protein coupled receptor homolog, suggests roles in

- early mammalian nervous system development. *Neuroscience* 79 (1): 217-24., 1997.
58. Mariani SM, Matiba B, Baumler C, Krammer PH. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol* 25 (8): 2303-7., 1995.
 59. Martinez-Granero MA, Pascual Pascual SI, Baquero Artigao F, de Ceano Vivas M, Pascual-Castroviejo I. [Hereditary amyotrophic neuralgia: two new cases]. *Neurologia* 12 (7): 307-12., 1997.
 60. Mattie M, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem* 269 (5): 3181-8., 1994.
 61. Melendez AJ, Carlos-Dias E, Gosink M, Allen JM, Takacs L. Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* 251 (1): 19-26., 2000.
 62. Meuleman J, Kuhlenbaumer G, Audenaert D, Hunermund G, Hor H, Young P, Stogbauer F, Ringelstein EB, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Timmerman V. Mutation analysis of 4 candidate genes for hereditary neuralgic amyotrophy (HNA). *Hum Genet* 108 (5): 390-3., 2001.
 63. Meuleman J, Kuhlenbaumer G, Schirmacher A, Wehnert M, De Jonghe P, De Vriendt E, Young P, Airaksinen E, Pou-Serradell A, Prats JM, Ringelstein B, Stogbauer F, Van Broeckhoven C, Timmerman V. Genetic refinement of the hereditary neuralgic amyotrophy (HNA) locus at chromosome 17q25. *Eur J Hum Genet* 7 (8): 920-7., 1999.
 64. Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Alemany R, Laser KT, Neumann E, Zhang C, Schmidt M, Rauen U, Jakobs KH, van Koppen CJ. Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G-protein-coupled receptors. *Embo J* 17 (10): 2830-7., 1998.
 65. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 (3): 1215., 1988.
 66. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. The N-terminal domain of tissue inhibitor of

- metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30 (33): 8097-102., 1991.
67. Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 248: 496-510, 1995.
 68. Nagase H. *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*. London: Taylor and Francis, p. 153-204, 1996.
 69. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274 (31): 21491-4., 1999.
 70. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365 (6446): 557-60., 1993.
 71. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (8): 2766-70., 1989.
 72. Orstavik K, Ro H, Orstavik KH. Recurrent brachial plexus neuropathy in a family with subtle dysmorphic features -- a case of hereditary neuralgic amyotrophy. *Clin Genet* 51 (6): 421-5., 1997.
 73. Orstavik K, Skard Heier M, Young P, Stogbauer F. Brachial plexus involvement as the only expression of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Muscle Nerve* 24 (8): 1093-6., 2001.
 74. Osthus A, Knauper V, Oberhoff R, Reinke H, Tschesche H. Isolation and characterization of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) from human rheumatoid synovial fluid. *FEBS Lett* 296 (1): 16-20., 1992.
 75. Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Shapiro SD, Campbell IL. Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* 152 (3): 729-41., 1998.
 76. Parks WC, Mecham RP. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego: Academic Press, 1998.

77. Parsonage MJ, Turner JWA. Neuralgic Amyotrophy: The Shoulder-Girdle Syndrome. *The Lancet* June 26: 974-78, 1948.
78. Pellegrino JE, George RA, Biegel J, Farlow MR, Gardner K, Caress J, Brown MJ, Rebbeck TR, Bird TD, Chance PF. Hereditary neuralgic amyotrophy: evidence for genetic homogeneity and mapping to chromosome 17q25. *Hum Genet* 101 (3): 277-83., 1997.
79. Pellegrino JE, Rebbeck TR, Brown MJ, Bird TD, Chance PF. Mapping of hereditary neuralgic amyotrophy (familial brachial plexus neuropathy) to distal chromosome 17q. *Neurology* 46 (4): 1128-32., 1996.
80. Pena JL, Marco M, Gros L, Lopez Pison J. [Spontaneous acquired localized neuropathies in childhood]. *Rev Neurol* 25 (142): 890-3., 1997.
81. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med* 3 (11): 1228-32., 1997.
82. Poffenbarger AL. Heredofamilial neuritis with brachial predilection. *W V Med J* 64 (11): 425-9., 1968.
83. Pohar N, Godenschwege TA, Buchner E. Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. *Genomics* 57 (2): 293-6., 1999.
84. Pyne S, Chapman J, Steele L, Pyne NJ. Sphingomyelin-derived lipids differentially regulate the extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal cascades in airway smooth muscle. *Eur J Biochem* 237 (3): 819-26., 1996.
85. Rani CS, Wang F, Fuior E, Berger A, Wu J, Sturgill TW, Beitner-Johnson D, LeRoith D, Varticovski L, Spiegel S. Divergence in signal transduction pathways of platelet-derived growth factor (PDGF) and epidermal growth factor (EGF) receptors. Involvement of sphingosine 1-phosphate in PDGF but not EGF signaling. *J Biol Chem* 272 (16): 10777-83., 1997.
86. Redford EJ, Smith KJ, Gregson NA, Davies M, Hughes P, Gearing AJ, Miller K, Hughes RA. A combined inhibitor of matrix metalloproteinase

- activity and tumour necrosis factor- α processing attenuates experimental autoimmune neuritis. *Brain* 120 (Pt 10): 1895-905., 1997.
87. Rius RA, Edsall LC, Spiegel S. Activation of sphingosine kinase in pheochromocytoma PC12 neuronal cells in response to trophic factors. *FEBS Lett* 417 (2): 173-6., 1997.
 88. Roger J, Pellicot A, Chabert. [Familial and recurring form of amyotrophic paralysis of the scapular girdle]. *Rev Neurol (Paris)* 112 (6): 557-9., 1965.
 89. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-86, 2000.
 90. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-91., 1988.
 91. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732): 1350-4., 1985.
 92. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12): 5463-7., 1977.
 93. Schuler GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* 75 (10): 694-8., 1997.
 94. Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tome P, Aggarwal A, Bajorek E, Bentolila S, Birren BB, Butler A, Castle AB, Chiannikulchai N, Chu A, Clee C, Cowles S, Day PJ, Dibling T, Drouot N, Dunham I, Duprat S, East C, Hudson TJ, et al. A gene map of the human genome. *Science* 274 (5287): 540-6., 1996.
 95. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12 (16): 3055-63., 1973.

96. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16 (2): 325-32., 1993.
97. Smith BH, Ramakrishna T, Schlagenhauff RE. Familial brachial neuropathy. Two case reports with discussion. *Neurology* 21 (9): 941-5., 1971.
98. Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukoc Biol* 65 (3): 341-4., 1999.
99. Spiegel S, Milstien S. Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1484 (2-3): 107-16., 2000.
100. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264 (29): 17374-8., 1989.
101. Stögbauer F, Timmerman V, Van Broeckhoven C. Hereditary recurrent focal neuropathies. In: 71st ENMC International Workshop, 6th Workshop of the European Charcot-Marie-Tooth Disease Consortium, Soestduinen, The Netherlands, 2000.
102. Stogbauer F, Young P, Kerschensteiner M, Ringelstein EB, Assmann G, Funke H. Recurrent brachial plexus palsies as the only clinical expression of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies associated with a de novo deletion of the peripheral myelin protein-22 gene. *Muscle Nerve* 21 (9): 1199-201., 1998.
103. Stogbauer F, Young P, Timmerman V, Spoelders P, Ringelstein EB, Van Broeckhoven C, Kurlemann G. Refinement of the hereditary neuralgic amyotrophy (HNA) locus to chromosome 17q24-q25. *Hum Genet* 99 (5): 685-7., 1997.
104. Taylor R. Heredofamilial mononeuritis multiplex with brachial predilection. *Brain* 83, 1960.
105. Thomas PK, Ormerod IE. Hereditary neuralgic amyotrophy associated with a relapsing multifocal sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56 (1): 107-9., 1993.

106. Tsairis P, Dyck PJ, Mulder DW. Natural history of brachial plexus neuropathy. Report on 99 patients. *Arch Neurol* 27 (2): 109-17., 1972.
107. Ungley C. Recurrent polyneuritis in pregnancy and the puerperium affecting three members of a family. *J Neurol Psychopathol* (14): 15-26, 1933.
108. van Alfen N, van Engelen BG, Reinders JW, Kremer H, Gabreels FJ. The natural history of hereditary neuralgic amyotrophy in the Dutch population: two distinct types? *Brain* 123 (Pt 4): 718-23., 2000.
109. Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, Thomas DM, Coopman PJ, Thangada S, Liu CH, Hla T, Spiegel S. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 142 (1): 229-40., 1998.
110. Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 274 (50): 35343-50., 1999.
111. Warot P, Petit H, Nuyts JP, Meignie S. [Familial brachial amyotrophic neuritis. Study of 2 families]. *Rev Neurol (Paris)* 128 (4): 281-8., 1973.
112. Watts GD, O'Briant KC, Borreson TE, Windebank AJ, Chance PF. Evidence for genetic heterogeneity in hereditary neuralgic amyotrophy. *Neurology* 56 (5): 675-678., 2001.
113. Wehnert M, Timmerman V, Spoelders P, Meuleman J, Nelis E, Van Broeckhoven C. Further evidence supporting linkage of hereditary neuralgic amyotrophy to chromosome 17q. *Neurology* 48 (6): 1719-21., 1997.
114. Wiederholt WC. Hereditary brachial neuropathy. Report of two families. *Arch Neurol* 30 (3): 252-4., 1974.
115. Willenbrock F, Crabbe T, Slocombe PM, Sutton CW, Docherty AJ, Cockett MI, O'Shea M, Brocklehurst K, Phillips IR, Murphy G. The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal

- domain interactions: a kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A. *Biochemistry* 32 (16): 4330-7., 1993.
116. Williamson RA, Marston FA, Angal S, Koklitis P, Panico M, Morris HR, Carne AF, Smith BJ, Harris TJ, Freedman RB. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J* 268 (2): 267-74., 1990.
 117. Windebank A. Inherited recurrent focal neuropathies. In: Dyck PJ TP, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (eds), ed. *Peripheral Neuropathy*. Vol. 2. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 1137-1148, 1993.
 118. Windebank AJ, Schenone A, Dewald GW. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and inherited brachial plexus neuropathy--two genetically distinct disorders. *Mayo Clin Proc* 70 (8): 743-6., 1995.
 119. Woessner JF, Jr. Role of matrix proteases in processing enamel proteins. *Connect Tissue Res* 39 (1-3): 69-73, 1998.
 120. Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 118 (1): 197-203., 1981.
 121. Xia P, Gamble JR, Rye KA, Wang L, Hii CS, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert AG, Barter PJ, Vadas MA. Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (24): 14196-201., 1998.
 122. Zuazo Zamalloa E, Pomposo Bolumburu I, Garaizar Axpe C, Prats Vinas JM. [Recurrent familial amyotrophic neuralgia of the brachial plexus. Report of a family and review of the literature]. *An Esp Pediatr* 37 (1): 47-51., 1992.

DANKSAGUNG

Zunächst möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. E. Ringelstein für die grundsätzliche Ermöglichung und Förderung dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich all den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der verschiedenen neurologischen Labore für ihre gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt:

Dipl.-Biologin Anja Schirmacher für den Start in die praktische Genetik, den Spaß bei der Arbeit und die Diskussion einer Vielzahl von sinnreichen und sinnfreien Themen.

Dr. med. Gregor Kuhlenbäumer für die Vermittlung der theoretischen Genetik, die umsichtige und hochkompetente Planung der Vorgehensweise ("bespreekings") sowie die freundliche Begleitung.

PD Dr. med. Florian Stögbauer für seine gute Betreuung und Hilfe sowie seine direkte und persönliche Art. Er ermöglichte maßgeblich das Arbeiten in einer herausragenden Atmosphäre.

Zuguterletzt bedanke ich mich aus ganzem Herzen bei Katja und meiner Familie für die stetige Unterstützung und den verlässlichen Rückhalt.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Gert Hünermund
Geburtsdatum: 24.04.1971
Geburtsort: Nairobi (Kenia)
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch
Konfession: Protestantisch

Familie:

Vater: Dr. med. vet. Georg Hünermund, Tierarzt
Mutter: Christel Hünermund, Hausfrau
Geschwister: Jann Hünermund, Arzt
Till Hünermund, Jurist
Kati Gessner, geb. Hünermund, Studentin
Ilka Hünermund, Schülerin

Ausbildung, Abschlüsse und Examina:

06/1990 Abitur mit der Note 1,2 am Wigbertgymnasium in Hünfeld (Kreis Fulda)
07/1990 bis 6/1991 Militärdienst als Sanitäter in Marburg und Hessisch-Lichtenau
Ab 10/1991 Beginn des Medizinstudiums an der Philipps-Universität-Marburg
09/1993 Ärztliche Vorprüfung
03/1995 1. medizinisches Staatsexamen
04/1995 bis 04/1996 Medizinstudium an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck, Österreich

| | |
|---------------------|--|
| 04/1996 | Fortführung des Medizinstudiums an der Philipps-Universität-Marburg |
| 1993 bis 1998 | Wiederholte Tätigkeit als studentische Hilfskraft in den Kursen für Anatomie, Neuroanatomie sowie Histologie am Institut für Anatomie der Philipps-Universität-Marburg |
| 09/1998 | 2. medizinisches Staatsexamen |
| 10/1998 bis 10/1999 | Praktisches Jahr mit dem Wahlfach Neurologie am Universitätsklinikum der Philipps-Universität-Marburg |
| 11/1999 | 3. medizinisches Staatsexamen und Abschluß des Medizinstudiums an der Philipps-Universität-Marburg mit der Gesamtnote „gut“ |
| 03/2000 | Beginn der ärztlichen Tätigkeit als AiP in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster, Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Ringelstein |
| 09/2001 | Fortführung der ärztlichen Tätigkeit als Assistent in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster, Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Ringelstein |
| 08/2000 bis 03/2002 | Labortätigkeit in der Arbeitsgruppe für Neurogenetik in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster, Projekt: Identifikation des ursächlichen Gendefektes der Hereditären Neuralgischen Amyotrophie Leiter: PD Dr. med. F. Stögbauer, Projektleiter: Dr. med. G. Kuhlenbäumer |
| 04/2002 | Fortführung der ärztlichen Tätigkeit als Assistent in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster, Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Ringelstein |

Stipendien:

- | | |
|-----------|---|
| 1992-1999 | Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes |
| 1993-1999 | Förderung eines Sprachkurses in England sowie mehrerer Auslandsfamulaturen durch die Studienstiftung des deutschen Volkes |

Famulaturen:

- | | |
|---------|--|
| 09/1994 | Einen Monat in der Abteilung für Innere Medizin des Diakoniekrankenhauses Marburg/Wehrda |
| 08/1995 | Einen Monat auf einer Station für Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Khon Kaen, Thailand |
| 01/1996 | Zwei Wochen in der Klinik für Psychiatrie der Leopold-Franzens-Universität, Innsbruck, Österreich |
| 03/1996 | Einen Monat im Neurologischen Krankenhaus „Maria-Theresien-Schlössl“ der Stadt Wien, Österreich |
| 03/1997 | Einen Monat in der Gemeinschaftspraxis für Radiologie Dres. med. Goecke, Crayen und Trittmacher, Erfahrung an CT- und MRT-Geräten |
| 11/1997 | Einen Monat am „Department of Clinical Neurosciences“ des „Western General Hospital“ der University of Edinburgh, Schottland, Direktoren: Prof. C. Warlow (Professor of Medical Neurology), Prof. I. Whittle (Professor of Surgical Neurology). |

Publikationen:

Poster:

Sitz J, Hünermund G, Hartmann P, Westermann R. Rapid and efficient isolation of adrenergic and noradrenergic cells, respectively, by immunopanning. 7. Annual Meeting des European Neuropeptide Club, Marburg, Germany, 1997.

Kuhlenbäumer G, Young P, Oberwittler C, Hünermund G, Schirmacher A, Ringelstein EB, Stögbauer F. Giant Axonal Neuropathy (GAN) caused by mutations in the gigaxonin gene. 74. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Aachen, Germany, 18.-23.9.01.

Hünermund G, Kuhlenbäumer G, Young P, Oberwittler Ch, Schirmacher A, Ringelstein EB, Stögbauer F. Giant Axonal Neuropathy (GAN) caused by mutations in the gigaxonin gene. 7th Annual Meeting, 8th Workshop of Neurogenetics, German Society of Neurogenetics, Magdeburg, Germany, 25.10.-27.10.01.

Vorträge:

Hünermund G, Meuleman J, De Jonghe P, Falck B, Young P, Stögbauer F, Timmerman V, Van Broeckhoven C, Ringelstein EB, Kuhlenbäumer G. Genetic Heterogeneity of Hereditary Neuralgic Amyotrophy (HNA). 74. Kongreß Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Aachen, Germany, 18.-23.9.01.

Hünermund G, Schirmacher A, Ringelstein EB, Young P, Stögbauer F, Kuhlenbäumer G. Genomic organisation and mutation analysis of 3 candidate genes for hereditary neuralgic amyotrophy (HNA). 75. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Mannheim, Germany, 25.-29.09.2002.

Artikel:

Meuleman J, Kuhlenbäumer G, Audenaert D, Hünermund G, Hor H, Young P, Stögbauer F, Ringelstein EB, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Timmerman V. Mutation analysis of 4 candidate genes for hereditary neuralgic amyotrophy (HNA). *Hum Genet* 2001 May;108(5):390-393.

Kuhlenbäumer G, Meuleman J, De Jonghe P, Falck B, Young P, Hünermund G, Van Broeckhoven C, Timmerman V, Stögbauer F. Hereditary Neuralgic Amyotrophy (HNA) is genetically heterogeneous. *Journal of Neurology*, Abstract Volume 248 Issue 10 (2001) pp 861-865.

Kuhlenbaumer G, Young P, Oberwittler C, Hunermund G, Schirmacher A, Domschke K, Ringelstein B, Stogbauer F. Giant axonal neuropathy (GAN): case report and two novel mutations in the gigaxonin gene. *Neurology*. 2002 Apr 23;58(8):1273-6.

Kuhlenbaumer G, Young P, Hunermund G, Ringelstein B, Stogbauer F. Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies. *J Neurol*. 2002 Dec; 249(12): 1629-50.

Hünermund G, Schirmacher A, Ringelstein B, Young P, Watts GD, Meuleman J, Nelis E, Chance P, Timmerman V, Stögbauer F, Kuhlenbäumer G. Genomic organisation and mutation analysis of three candidate genes for Hereditary Neuralgic Amyotrophy (HNA). Zur Publikation angenommen im Dezember 2003 durch *Muscle & Nerve*.